

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLEVERTON LUIZ PIRICH

OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA E SUA
APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS
COM XILOGLUCANA DE *Tamarindus indica* L.

CURITIBA
2013

CLEVERTON LUIZ PIRICH

OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA E SUA
APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS
COM XILOGLUCANA DE *Tamarindus indica* L.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Rita Sierakowski
Co-orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

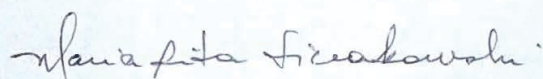
CURITIBA
2013

TERMO DE APROVAÇÃO

CLEVERTON LUIZ PIRICH

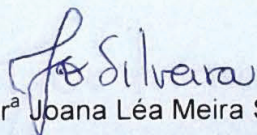
OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA E SUA APLICAÇÃO NO REVESTIMENTO DE NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS COM XILOGLUCANA DE *Tamarindus Indica* L.

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



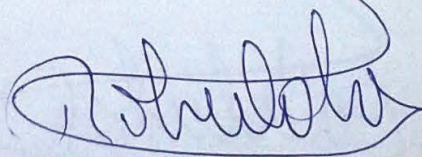
Profª Drª Maria Rita Sierakowski (Orientadora)

Departamento de Química – UFPR



Profª Drª Joana Léa Meira Silveira

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof Dr. Roberto Pontarolo

Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPR

Curitiba, 06 de março de 2013.

Aos meus pais, Gabriel Pirich e
Cláudia Stavacz, e a minha avó,
Maria Pirich, pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A minha família, principalmente aos meus pais Gabriel Pirich e Cláudia Stavacz e minha avó Maria pela ajuda e o apoio.

A minha noiva e futura esposa Gabriela Galves Nunes, que sempre esteve ao meu lado durante todo esse percurso me apoiando, incentivando, me fazendo feliz, me completando. Obrigado por ter entrado em minha vida.

Aos professores Dra. Maria Rita Sierakowski e Dr. Rilton Alves de Freitas, pela amizade, pelos valiosos ensinamentos, paciência e ótima orientação que me proporcionaram grande crescimento durante o mestrado.

A professora Dra. Joana Lea Meira Silveira por ter aceitado fazer parte da minha banca e, também, por ter contribuído para melhorar este trabalho desde a apresentação do projeto.

Aos professores Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti e Dr. Roberto Pontarolo por aceitarem fazer parte da minha banca e contribuírem em meu trabalho.

A Membracel Produtos Tecnológicos Ltda por fornecer as aparas de celulose bacteriana utilizadas neste trabalho.

Ao doutorando Marco Aurélio Woehl não só pelas imagens de microscopia de força atômica, mas, também, por todo apoio e ensinamentos que me deu desde o início do mestrado.

A professora Dra. Graciela I. B- de Muniz, a MSc. Daniele Cristina Potulski e a Dra. Eliane Lopes da Silva do Departamento de Engenharia Florestal da UFPR por permitir, e auxiliarem na utilização do moinho Supermasscolloider para o processamento das aparas de celulose bacteriana.

Ao professor Dr. José Manuel dos Reis Neto, e a Elisiane R. Pescini do LAMIR – UFPR por permitir, e terem ajudado nas análises de granulometria a laser.

Ao doutorando Fábio Lisboa e ao professor doutor Fernando Wypych pelas análises de difratometria de raios-X.

Ao professor Dr. Lionel Gamarra (Instituto Cérebro, Hospital Albert Einstein) por permitir as análises de potencial zeta.

Aos mestrandos Guilherme Fadel Pichet e Gabriel Kaminski pelas análises de potencial zeta, pela amizade e apoio durante o mestrado.

A professora Dra. Denise F.S. Petri do IQ-USP/SP, e ao doutorando Leandro Blachechen por permitir, e ajudarem nas análises por elipsometria.

À Dra. Francine Valenga e ao doutorando Clayton Fernandes de Souza pela grande ajuda e contribuições que forneceram para o meu trabalho.

Aos demais colegas e a família BIOPOL que me receberam e ajudaram em diferentes momentos.

A todos os professores e colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR que, de uma maneira ou outra, contribuíram para minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho.

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) da UFPR e a todos os demais colaboradores do Programa.

Ao Departamento de Química da UFPR pelo acesso aos equipamentos multiusuários.

A CAPES, CNPQ e ao programa REUNI, pelo auxílio financeiro.

*"I think and think for months and years.
Ninety-nine times, the conclusion is
false. The hundredth time I am right"*

Albert Einstein.

RESUMO

O desenvolvimento de materiais ecologicamente sustentáveis é de grande interesse industrial e científico por utilizar fontes de origem renovável, com baixo custo e alta biocompatibilidade. Entre os candidatos de grande potencial estão os nanocristais de celulose (NC) e a xiloglucana (XG). Observando que na parede celular vegetal as microfibrilas de celulose com a XG se organizam em complexas redes polissacarídicas pode-se utilizá-las mimetizando, em laboratório, a síntese de biocompósitos como nanofilmes, ou revestimentos tridimensionais. Na literatura, as condições de obtenção desses biocompósitos, são pouco relatadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e otimizar os processos para a obtenção de partículas estáveis de NC adsorvidas com XG, para o desenvolvimento de revestimentos tridimensionais. Para tal, utilizamos como matérias primas a celulose de fonte bacteriana (CB), para sintetizar e isolar nanocristais de celulose bacteriana (NCB) e, a XG de sementes de *Tamarindus indica*, para os ensaios de adsorção. Os NCB foram produzidos por diferentes hidrólises (radicalar, com CH_2O_2 , H_2SO_4 , HCl e com a mistura híbrida entre H_2SO_4 e HCl [Hbd]). Após o isolamento, os NCB foram caracterizados em função de seu tamanho, carga, cristalinidade e morfologia, por granulometria a laser, espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta ($\text{p}\zeta$); difratometria de raios-X (DRX), e microscopia de força atômica (MFA). O revestimento NCB-XG foi avaliado através da isoterma de Langmuir, determinando a proporção de massa por colorimetria (I_2/KI), seguida dos ensaios por $\text{p}\zeta$, DLS e MFA. Também, foi realizada a síntese de nanofilmes por multicamadas alternadas de NCB e XG aplicando a técnica de automontagem (do inglês *Layer by Layer* – *LbL*). A deposição das camadas foi avaliada por microbalança de cristal de quartzo (MCQ), pela perda e ganho de massa. A rugosidade (RMS) das camadas foi medida por MFA, e a espessura (d_x) por elipsometria. Nos resultados observou-se que somente as hidrólises ácidas (HCl , H_2SO_4 Hbd) obtiveram êxito no isolamento dos NCB, onde as medidas por granulometria a laser sugeriram tamanhos inferiores aos obtidos por CH_2O_2 e radicalar. Os atributos dos NCB isolados a partir das hidrólises com HCl (NCB- HCl), H_2SO_4 (NCB- H_2SO_4) e da mistura híbrida destes ácidos (NCB-Hbd) diferiram significativamente somente no valor do potencial zeta (-4,8 a -45,6 mV) dependendo do grau de sulfatação. Na interação com a XG o grau de sulfatação apresentou efeitos tanto negativos, quando em maior grau [NCB- H_2SO_4 vs NCB- HCl : 211 vs 235 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ ($\text{XG}.\text{NCB}^{-1}$)], quanto positivos, quando em menor grau [NCB-Hbd vs NCB- HCl : 235 vs 275 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ ($\text{XG}.\text{NCB}^{-1}$)]. Dessa forma, por apresentar a maior adsorção, o NCB-Hbd foi escolhido para a síntese das partículas de NCB-XG. As análises dos filmes multicamadas demonstraram a formação de um sistema composto por deposição de camadas espessas de NCB (9,86 nm) e finas de XG (3,84 nm), com superfícies relativamente homogêneas (RMS: NCB/XG: 3,71/3,41 nm). Nós demonstramos, pela primeira vez, em literatura, a influência de modificações na superfície de NCB na interação com XG, obtendo NCB com maior adsorção a XG. Otimizamos as condições para obtenção de nanopartículas estáveis em solução de NCB-XG e seu potencial na aplicação para revestimentos homogêneos de partículas tridimensionais pela técnica de LbL.

Palavras chave: nanocristais de celulose, celulose bacteriana, xiloglucana, revestimento tridimensional.

ABSTRACT

The development of environmentally friendly and sustainable materials represents great interest for industrial and scientific applications due their renewability (renewable sources), combined with low cost and high biocompatibility. Among the great potential candidates, there are cellulose nanocrystals (NC) and xyloglucan (XG). In plant cell wall, NC and XG are organized in complex polysaccharide chains in structures that might be mimic in laboratory conditions, targeting the development of biocomposites, as nanofilms or tridimensional coating, the last one case practically unexplored in scientific databases. Therefore, this study aims the development and optimization of several processes to obtain stable particles of NC for tridimensional coating with XG. Bacterial cellulose (BC) was used as raw material to isolate its nanocrystals, NCB, and XG from *Tamarindus indica* seeds for the adsorption experiments. NCB were isolated by various hydrolysis process (radical, CH_2O_2 , H_2SO_4 , HCl and a mix of HCl and H_2SO_4 [Hbd]), and were characterized by average size distribution using laser granulometry, dynamic light scattering, (DLS), net charge through zeta potential ($\text{p}\zeta$), crystallinity with x-ray diffraction (XRD) and morphology by AFM. Coating was evaluated in solution through Langmuir isotherm assays using the I2/KI colorimetric method, $\text{p}\zeta$, DLS and by AFM. In a second process, the Layer by Layer technique was utilized to coat NCB particles, evaluating mass loss and uptake through quartz crystal microbalance (QCM); thickness and roughness by ellipsometry and AFM, respectively. Only HCl , H_2SO_4 and Hbd hydrolysis succeeded to isolate the NCB, exhibiting lower size distribution values than compared methods, showing greater process efficiency. NCB characteristics isolated by HCl (NCB- HCl), Hbd (NCB-Hbd) and H_2SO_4 (NCB- H_2SO_4) differ only in zeta potential values (-4,8 mV to -45,6 mV) depending of sulfate content. Sulfation reaction exhibited negative effects, when present in a greater content (NCB- H_2SO_4 vs NCB- HCl : 211 vs 235 $\mu\text{gXG.mgNCB}^{-1}$), as well as positive whenever in a minor content (NCB-Hbd vs NCB- HCl : 235 vs 275 $\mu\text{gXG.mgNCB}^{-1}$), on the interaction with XG. Therefore, NCB-Hbd was chosen to synthesize NCB-XG particles due to its higher adsorption rate. Analysis by QCM, AFM and ellipsometry showed a multilayer of NCB-XG composed by a thick layer of NCB (9.86 nm) and thin of XG (3.84 nm) with a relative homogenous surface (NCB/XG roughness: 3.71/3.41 nm). Thus, NCB synthesis was optimized, revealing higher adsorption to XG and demonstrating the coating of stable and homogenous NCB-XG multilayer for application of tridimensional nanoparticles in solution.

Keywords: cellulose nanocrystals, bacterial cellulose, xyloglucan, tridimensional coating.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE.....	18
FIGURA 02 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BIOSÍNTESE DA CELULOSE .	19
FIGURA 03 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA CRISTALINA DA CELULOSE EM VEGETAIS	20
FIGURA 04 – MODELO DAS ALOMORFIAS DA CELULOSE I.....	21
FIGURA 05 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CELULOSE BACTERIANA	22
FIGURA 06 – MECANISMO DE HIDRÓLISE DA CELULOSE.....	26
FIGURA 07 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA XILOGLUCANA DE SEMENTES DE TAMARINDO	27
FIGURA 08 – CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DE <i>T. indica</i> E ILUSTRAÇÃO DAS PARTES DAS PLANTAS	28
FIGURA 09 – ESQUEMA DE ADSORÇÃO DE XILOGLUCANA (XG) EM NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NC).....	30
FIGURA 10 – GRANULOMETRIA A LASER DA COMPARAÇÃO DA MASSA TOTAL DA HIDRÓLISE DA CELULOSE BACTERIANA POR VIA RADICALAR VS HCl E H ₂ SO ₄	44
FIGURA 11 – GRANULOMETRIA A LASER DA COMPARAÇÃO DA MASSA TOTAL DA HIDRÓLISE DA CELULOSE BACTERIANA COM CH ₂ O ₂ (4 À 9H) VS HCl E H ₂ SO ₄ (120 MIN)	45
FIGURA 12 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA ($p\zeta$) DOS NANOCRISTAIS (NCBS) ISOLADOS	47
FIGURA 13 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCBS) AVALIADOS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	48
FIGURA 14 – IMAGENS TOPOGRÁFICAS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) ISOLADOS	49
FIGURA 15 – DIFRACTOGRAMAS DA CELULOSE BACTERIANA PROCESSADA (CBp) E DOS SEUS NANOCRISTAIS (NCB) ISOLADOS	50

FIGURA 16 – ISOTERMA AVALIANDO A ADSORÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCBS) ISOLADOS	52
FIGURA 17 – ISOTERMA DA ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) ISOLADOS, EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE XG	53
FIGURA 18 – LINEARIZAÇÃO DE LANGMUIR DOS DADOS OBTIDOS DA ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCBS) ISOLADOS, EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE XILOGLUCANA (XG).....	54
FIGURA 19 – REVESTIMENTO DA SUPERFÍCIE DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) POR XILOGLUCANA (XG) ACOMPANHADO POR MUDANÇAS NO POTENCIAL ZETA ($p\zeta$)	56
FIGURA 20 – COMPARAÇÃO DOS DIÂMETROS HIDRODINÂMICO APARENTE AVALIADOS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO DA XILOGLUCANA (XG) E NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) ISOLADOS, E APÓS ADSORVIDOS (NCB-XG)	57
FIGURA 21 – MORFOLOGIAS POR TOPOGRAFIAS DE IMAGEM DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) E DA ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) A NCB	59
FIGURA 22 – ADSORÇÃO DE XILOGLUCANA (XG) A NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) POR AUTOMONTAGEM (<i>LbL</i>) ACOMPANHADA POR MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (MCQ).....	60
FIGURA 23 – ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) A NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) POR AUTOMONTAGEM (<i>LbL</i>), ACOMPANHADA POR ELIPSOMETRIA	61
FIGURA 24 – ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) A NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) POR AUTOMONTAGEM (<i>LbL</i>) ACOMPANHADA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – COMPARAÇÃO ENTRE OS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) ISOLADOS QUANTO AO RENDIMENTO E DIMENSÕES DE ACORDO COM OS PROCESSOS DAS HIDRÓLISES	49
TABELA 02 – AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS DIFRACTOGRAMAS OBTIDOS DA CELULOSE BACTERIANA PROCESSADA (CBp) E DOS SEUS NANOCRISTAIS (NCB) ISOLADOS	51
TABELA 03 – QUANTIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS PELAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) AOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCBS) ISOLADOS.....	55
TABELA 04 – MÉDIAS DAS DIMENSÕES, DA ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) SOBRE OS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB), AVALIADAS POR TOPOGRAFIAS DE IMAGEM DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)	59
TABELA 05 – MÉDIA DA ESPESSURA E RUGOSIDADE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) DA ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) A NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) POR AUTOMONTAGEM (LBL)	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

- **a**: dependência da concentração de XG sob o decaimento do potencial zeta
- **CB**: celulose bacteriana
- **CBp**: celulose bacteriana processada com moinho e ultrassom
- **C_e**: concentração em equilíbrio do adsorvido XG
- **d**: espaçamento entre os planos cristalinos da celulose
- **DAC**: dimensões aparentes dos cristalitos da celulose
- **DLS**: espalhamento de luz dinâmico
- **DRX**: difratometria de raios-X
- **DP**: grau de polimerização
- **GPa**: giga Pascal, unidade de módulo elástico de Young
- **Hbd**: hidrólise realizada com a mistura de HCl e H₂SO₄
- **IC**: índice de cristalinidade
- **K**: constante de adsorção/desorção
- **LbL**: técnica de automontagem em multicamadas, do inglês: *Layer by Layer*
- **MCQ**: microbalança de cristal de quartzo
- **M_cNCB-XG**: multicamadas alternadas de NCB e XG
- **MFA**: microscopia de força atômica
- **NC**: nanocristais de celulose
- **NCB**: nanocristais de celulose bacteriana
- **NCB-Hbd**: NCB isolados por hidrólise Hbd
- **NCB-HCl**: NCB isolados por hidrólise com HCl
- **NCB-H₂SO₄**: NCB isolados por hidrólise com H₂SO₄
- **NCB-XG**: NCB revestidos com XG
- **PEI**: Polietilenimina
- **Q_e**: quantidade de amostra adsorvida (XG) em um suporte (NCB)
- **Q_{max}**: capacidade teórica de adsorção máxima do adsorvido (XG) em um suporte (NCB)
- **pζ**: potencial zeta
- **Rh**: raio hidrodinâmico aparente dos nanocristais de celulose bacteriana
- **XG**: xiloglucana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVO GERAL.....	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 CELULOSE.....	18
2.1.1 Celulose bacteriana (CB)	22
2.1.2 Melhoria das propriedades físico-químicas da celulose voltada para a síntese de biocompósitos	23
2.1.3 Aumento da cristalinidade da celulose por tratamento de ultrassom	24
2.1.4 Obtenção de nanocristais de celulose por hidrólise ácida.....	25
2.2 XILOGLUCANA (XG).....	27
2.2.1 Xiloglucana de <i>Tamarindus indica</i>	28
2.3 INTERAÇÃO ENTRE XILOGLUCANA E CELULOSE	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 MATERIAIS	31
3.2 PRÉ-TRATAMENTO DA CELULOSE BACTERIANA PARA AS REAÇÕES DE HIDRÓLISE	32
3.2.1 Processamento da celulose bacteriana com moinho	32
3.2.2 Processamento da celulose bacteriana por ultrasonicação	32
3.2.3 Determinação do teor de matéria seca da celulose processada	32
3.3 TÉCNICAS DE OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DE CRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA	33
3.3.1 Hidrólise radicalar.....	33
3.3.2 Hidrólise com ácido fórmico	33
3.3.3 Hidrólises com ácido clorídrico e ácido sulfúrico	34
3.3.4 Hidrólise com uma mistura de ácidos clorídrico e sulfúrico (Hbd).....	34
3.4 CARACTERIZAÇÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) E DE NANOCOMPÓSITOS REVESTIDOS COM XILOGLUCANA (XG)	35
3.4.1 Granulometria a laser.....	35
3.4.2 Medidas da adsorção da xiloglucana sobre nanocristais de celulose bacteriana avaliadas pelo potencial zeta ($p\zeta$).....	36

3.4.3	Medidas da adsorção da xiloglucana sobre nanocristais de celulose bacteriana avaliadas pelo espalhamento de luz dinâmico (DLS)	37
3.4.4	Avaliação do índice de cristalinidade da celulose bacteriana e seus nanocristais através de difratometria de raios-X (DRX)	38
3.4.5	Preparo das amostras e análises por microscopia de força atômica (MFA)	39
3.4.6	Acompanhamento do crescimento de nanofilmes multicamadas através da microbalança de cristal de quartzo	40
3.4.7	Acompanhamento do crescimento de filmes multicamadas através de elipsometria	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	PROCESSAMENTO	42
4.2	ESCOLHA DO MÉTODO DE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB).....	42
4.2.1	Hidrólise radicalar.....	42
4.2.2	Hidrólise com ácido fórmico	45
4.2.3	Obtenção e caracterização dos NCB isolados as com ashidrólises por HCl, H ₂ SO ₄ e Hbd	46
4.2.4	Escolha do processo para obter os nanocristais de celulose bacteriana para os testes de adsorção com a xiloglucana.....	51
4.3	Adsorção da xiloglucana com nanocristais de celulose bacteriana	55
5	CONCLUSÕES.....	64
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	65
7	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

O aumento da consciência ambiental tem levado cientistas e indústrias a buscarem estratégias para o desenvolvimento de produtos ecologicamente sustentáveis que, muitas vezes, podem ser inspirados pelos recursos naturais. Exemplos de fontes em potencial para essa aplicabilidade são os nanocristais de celulose (NC) e os hidrocolóides como as xiloglucanas (XG). Esses polissacarídeos possuem forte interação conhecida entre si, provêm de fontes de origem renovável, são extremamente abundantes na natureza, apresentam baixa toxicidade, e possuem propriedades físicas e físico-químicas adequadas à síntese de biocompósitos (SHIRAKAWA *et al.*, 1998; KÜMMERER *et al.*, 2011).

Os NC são correspondentes às regiões cristalinas de estruturas celulósicas. Eles podem ser isolados através de tratamentos químicos, mecânicos e/ou enzimáticos (FILSON *et al.*, 2009; KALASHNIKOVA *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-SANZ *et al.*, 2011). Após o tratamento para isolá-los, eles apresentam propriedades mecânicas superiores como: maior grau de cristalinidade ($\approx 90\%$) e módulo elástico (≈ 110 GPa) em comparação com a celulose nativa (cristalinidade: $\approx 70\%$ e módulo elástico: ≈ 10 GPa) (HSIEH *et al.*, 2008).

Em função do seu potencial em melhorar as propriedades físico-químicas de matrizes poliméricas, os NC vêm sendo avaliados como material de reforço (IGUCHI *et al.*, 2000; SAMIR *et al.*, 2005; ABE *et al.*, 2007; HSIEH *et al.*, 2008). As propriedades dos NCs podem variar de acordo com a origem da celulose escolhida para a geração desses. Uma das fontes de celulose que vem chamando grande atenção dos pesquisadores na síntese de biocompósitos é a de origem bacteriana (CB). Isso se deve as vantagens que essa fonte possui sobre a de origem vegetal como: facilidade de purificação, maior grau de cristalinidade, hidratação e de polimerização (IGUCHI *et al.*, 2000; GELIN *et al.*, 2007; GEORGE *et al.*, 2011).

Já as XG são polissacarídeos de importante interesse industrial. Como exemplos, temos a sua utilização como espessante na indústria alimentícia (BHATTACHARYA *et al.*, 1991; MAEDA *et al.*, 2007), potencial excipiente para administração de fármacos como veículo gastroresistente (COVIELLO *et al.*, 2007) e carreadora de fármaco antitumoral (RIBEIRO *et al.*, 2009) nas indústrias farmacêuticas e médica, entre outros usos. Essa hemicelulose possui função

estrutural na parede celular, e de reserva no endosperma de sementes de mono e dicotiledôneas, respectivamente. Em seu estado nativo, as XG estruturais estão fortemente associadas às microfibrilas de celulose, principalmente através de ligações de hidrogênio, formando uma rede de estrutura rígida (HAYASHI, 1989; CARPITA; GIBEAUT, 1993). Essa complexa rede polissacarídica é apontada ser a principal determinante das propriedades mecânicas da parede celular vegetal de dicotiledôneas (LEVY *et al.*, 1991).

Estudos realizados vêm tentando aproveitar essa grande afinidade que a XG tem com a celulose e suas propriedades mecânicas e físico-químicas excepcionais, para sintetizar compósitos a base de XG e NC (LIMA *et al.*, 2004; JEAN *et al.*, 2008; CERCLIER *et al.*, 2010; LOPEZ *et al.*, 2010; ERONEN *et al.*, 2011). Tais estudos originaram esses compósitos através de técnicas como evaporação do solvente, *spin-coating*, entre outras, com a finalidade de produção de filmes bidimensionais (membranas, revestimento de superfícies, etc). Entretanto, os dados de adsorção, podem não ser equivalentes para revestimento de sistemas tridimensionais, como no revestimento de partículas em solução. Esse revestimento pode adicionar a diferentes partículas um efeito protetor, aprimorar suas propriedades mecânicas e físico-químicas, ter um maior controle de liberação de fármacos, entre outras aplicações.

Com base no apresentado, o objetivo deste trabalho foi testar a adsorção da XG em nanocristais de celulose bacteriana (NCB) em solução, otimizando a síntese de nanopartículas estáveis de NCB revestidas com XG, avaliando assim a capacidade de revestimento tridimensional de partículas.

1.1 OBJETIVO GERAL

Obter nanocristais de celulose bacteriana com alta adsorção por xiloglucana de sementes de *Tamarindus indica* L e utilizar esses biopolímeros para desenvolver nanopartículas estáveis em solução e demonstrar seus potenciais no revestimento tridimensional de partículas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aumentar a área superficial da amostra de celulose bacteriana (CB) através de seu processamento em moinho e ultrassom;
- Caracterizar a CB processada através de granulometria a laser e difratometria de raios-x (DRX);
- Obter diferentes nanocristais da celulose bacteriana (NCB), através de hidrólises: radicalar, com CH_2O_2 , H_2SO_4 , HCl e com uma mistura de H_2SO_4 e HCl (Hbd);
- Caracterizar os NCB através de técnicas como espalhamento de luz dinâmico (DLS), Difratometria de raio X (DRX), potencial zeta ($\text{p}\zeta$) e microscopia de força atômica (MFA);
- Quantificar a adsorção de XG a NCB por isoterma de Langmuir, DLS, $\text{p}\zeta$, MFA e microbalança de cristal de quartzo (MCQ);
- Avaliar a estabilidade das partículas de XG-NCB por DLS e $\text{p}\zeta$;
- Produzir sistemas em multicamadas alternadas de XG e NCB ($\text{M}_c\text{NCB-XG}$), pela técnica de automontagem (*Layer by Layer*) e caracterizá-los por MCQ, MFA e elipsometria.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CELULOSE

A celulose está entre os biopolímeros mais importantes tanto em abundância, quanto em possibilidades de utilização. Sua principal função em organismos pluricelulares é estrutural. Ela é produzida por uma grande variedade de organismos como: bactérias, algas, tunicados e vegetais superiores. Estima-se que, sua disponibilidade total na biosfera, seja da ordem de 20 a 30.10¹⁰ t (FENGEL, 1989; MATHEW; DUFRESNE, 2002).

Esse carboidrato é um homopolissacarídeo linear constituído de unidades de *D*-glucopiranosose unidas por ligação glicosídica do tipo β -(1 \rightarrow 4). O fato da celulose, o biopolímero mais abundante na biosfera, ser constituída por moléculas de glucose não é fortuito. Isso é resultante da conformação excepcionalmente estável adquirida pela *D*-glucose em sua forma cíclica, constituindo a *D*-glucopiranosose. Nela, as hidroxilas do anel hemiacetálico se encontram em posição equatorial ao plano do anel. Uma estabilidade adicional é dada a celulose em função das hidroxilas do carbono anomérico das glucoses também estarem em posição equatorial, resultando em uma ligação mais estável (ligação β), do que se estivesse em posição axial (ligação α), como ilustrado na FIGURA 01-A. A estrutura básica desse polissacarídeo consiste de duas unidades de glucose conectadas com orientação de 180° entre si, denominada de celobiose (4-O- α -*D*-glucopiranosil- α -*D*-glucopiranosose, (FIGURA 01-B) (SOLOMONS, 1996).

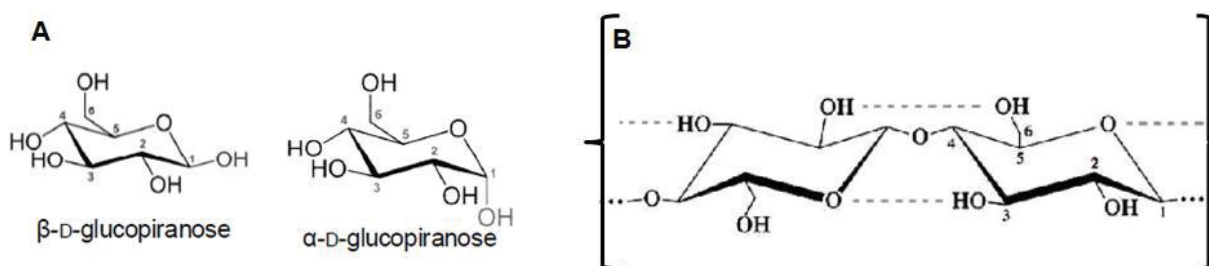


FIGURA 01 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE

FONTE: Adaptado de Zugenmaier (2001)

(A) isômeros da *D*-glucose e (B) do dímero denominado de celobiose

Essa conformação adotada pode ser explicada ao analisar o modelo de biossíntese de celulose (KOYAMA *et al.*, 1997) ilustrado na FIGURA 02. Nela, duas unidades de uridina-difosfatoglucose (UDP-glucose) são ligadas com grande afinidade a dois sítios ativos da enzima celulose sintase (1), posicionados a 180° um do outro. Ao se ligarem as hidroxilas em C-5 das unidades de glucose então são ativadas por um mecanismo de catálise básica geral, promovendo a desfosforilação das unidades de UDP-glucose e a formação da ligação β -(1 \rightarrow 4) (2). A β -glucana resultante, por apresentar baixa afinidade com os sítios de ligação a UDP-glucose, se desloca a uma região mais favorável (3), um sítio de ligação a β -glucana, podendo assim prosseguir a síntese com novas adições de celobioses.

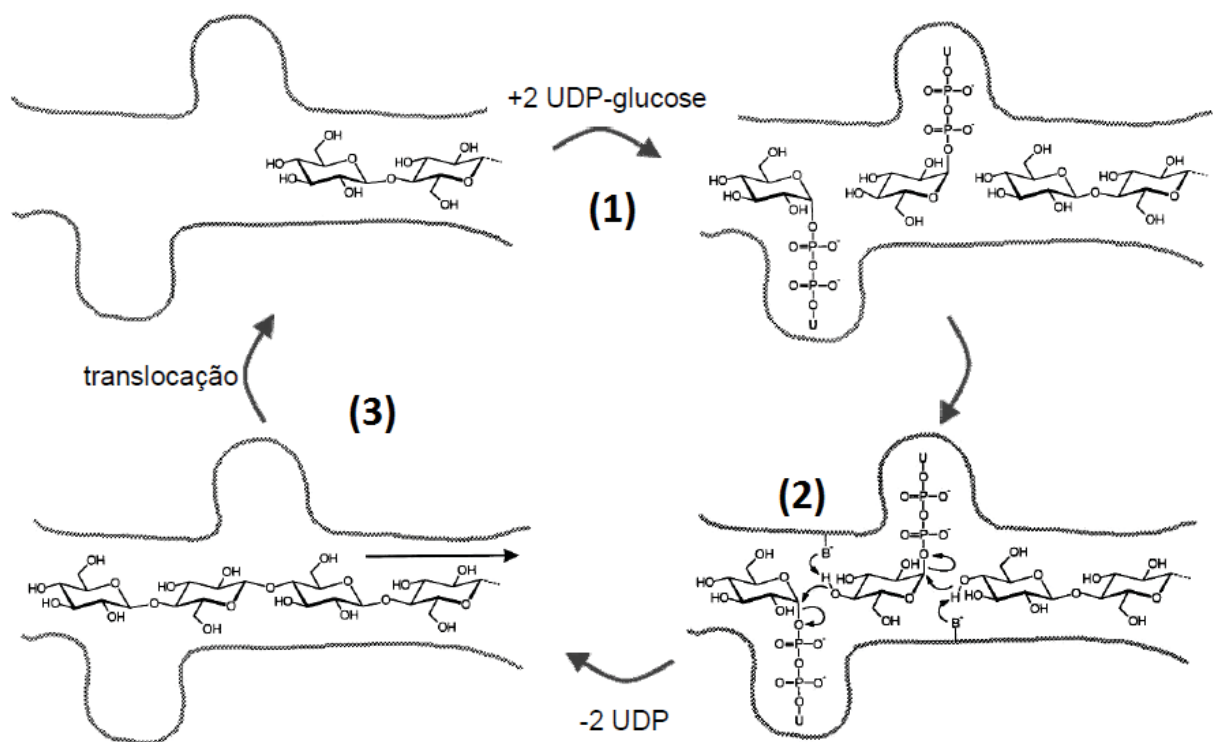


FIGURA 02 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA BIOSÍNTESE DA CELULOSE
 FONTE: Adaptado de Koyama *et al.* (1997)

Devido à conformação da celobiose, forças coesivas intracadeia são formadas, dadas por ligações de hidrogênio entre as hidroxilas, fazendo com que a cadeia adote uma conformação linear rígida, e cujo tamanho é variado e é classificado de acordo com o número de unidades de anidrogucose presentes, denominado grau de polimerização (DP). O DP pode variar desde 2.400, como na

planta *Equisetum arvense*, até 15.300 na fibra de algodão (*Gossypium*) não tratada (FENGEL, 1989; SJÖSTRÖM, 1993; RAMOS, 2003).

Entretanto, as cadeias de celulose, naturalmente, não são encontradas isoladas. Devido à conformação linear adotada e a posição espacial das hidroxilas, as cadeias conseguem interagir fortemente entre si através de ligações de hidrogênio intercadeias (FIGURA 03-A), e organizando-se em blocos cristalinos (denominados fibrilas elementares) com superfície hidrofílica e interior hidrofóbico, cuja espessura varia de 2 a 6 nm (FIGURA 03-B) (RAMOS, 2003).

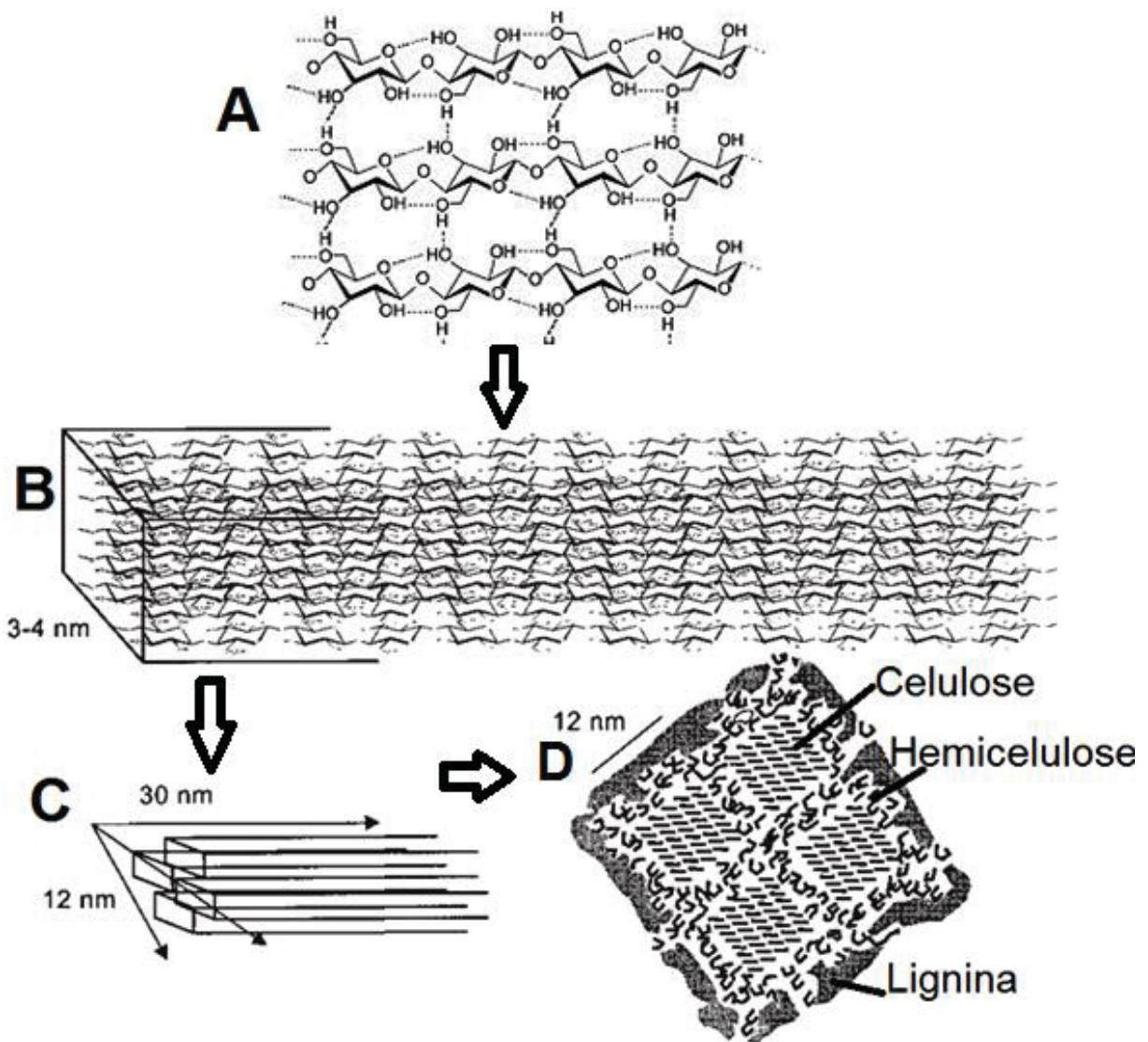


FIGURA 03 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA CRISTALINA DA CELULOSE EM VEGETAIS

FONTE: Adaptado de Ramos (2003)

A) Interação entre as cadeias de celulose B) Fibrilas elementares C) Cristalitos e D) Microfibrilas

Essas fibrilas associam-se em cristalitos (FIGURA 03-C) cuja seção transversal pode chegar a 12 nm. Em vegetais superiores, tais cristalitos encontram-se envoltos numa matriz de lignina, sendo que as hemiceluloses compatibilizam as duas fases dessa estrutura conhecida como microfibrila (FIGURA 03-D). As microfibrilas também apresentam regiões onde as moléculas são distribuídas ao acaso (regiões amorfas) (RAMOS, 2003).

Dependendo de como as cadeias de celulose estão orientadas entre si, essas associações podem ser divididas entre quatro tipos de celulose. A celulose nativa ou celulose I possui orientação paralela. A mercerizada (celulose II) possui orientação antiparalela e é resultante do tratamento alcalino da celulose I. O tratamento da celulose I com amônia líquida origina a celulose III. Ao submeter a celulose III a altas temperaturas com glicerol origina-se a celulose IV (HAYASHI *et al.*, 1975; ZUGENMAIER, 2001).

Attala e Vanderhart (1984) detectaram, a partir de análises de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (^{13}C -RMN), dois sistemas de cristalinidade na celulose nativa, uma monoclinica (celulose I_β) e outra triclinica (celulose I_α), como ilustrados na FIGURA 04. A diferença entre essas alomorfias é explicada pelos ângulos formados entre as ligações de hidrogênio das cadeias de celulose. A forma I_α é menos estável termodinamicamente, sendo mais facilmente removida em tratamentos de hidrólise (HORRI, 2001).

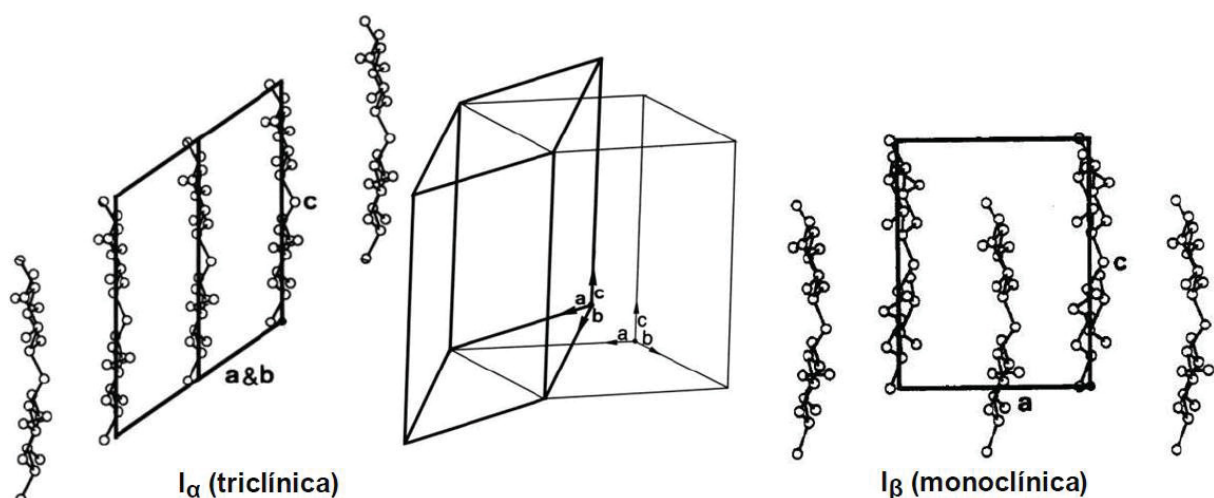


FIGURA 04 – MODELO DAS ALOMORFIAS DA CELULOSE I
 FONTE: Adaptado de Zugenmaier (2001)

2.1.1 Celulose bacteriana (CB)

Conhecida desde os tempos antigos pelos produtores de vinagre e cerveja na Europa como “planta” ou “mãe” do vinagre, a celulose bacteriana (CB) é do tipo I e apresenta estrutura química idêntica a celulose vegetal. Atualmente, a CB vem atraindo a atenção de pesquisadores quanto à síntese de biocompósitos, devido a sua facilidade de obtenção, purificação, e por suas características físico-químicas como elevada cristalinidade, grau de polimerização (de 16.000 a 20.000), entre outras (MATHEW; DUFRESNE, 2002; LIMA *et al.*, 2004; ERONEN *et al.*, 2011).

Ela é produzida por cepas do gênero *Acetobacter sp.* e aparece na superfície dessas colônias como uma película gelatinosa e translúcida formada por uma rede aleatória de microfibrilas com diâmetro inferior a 100 nm, entremeadas por regiões amorfas (FIGURA 05).

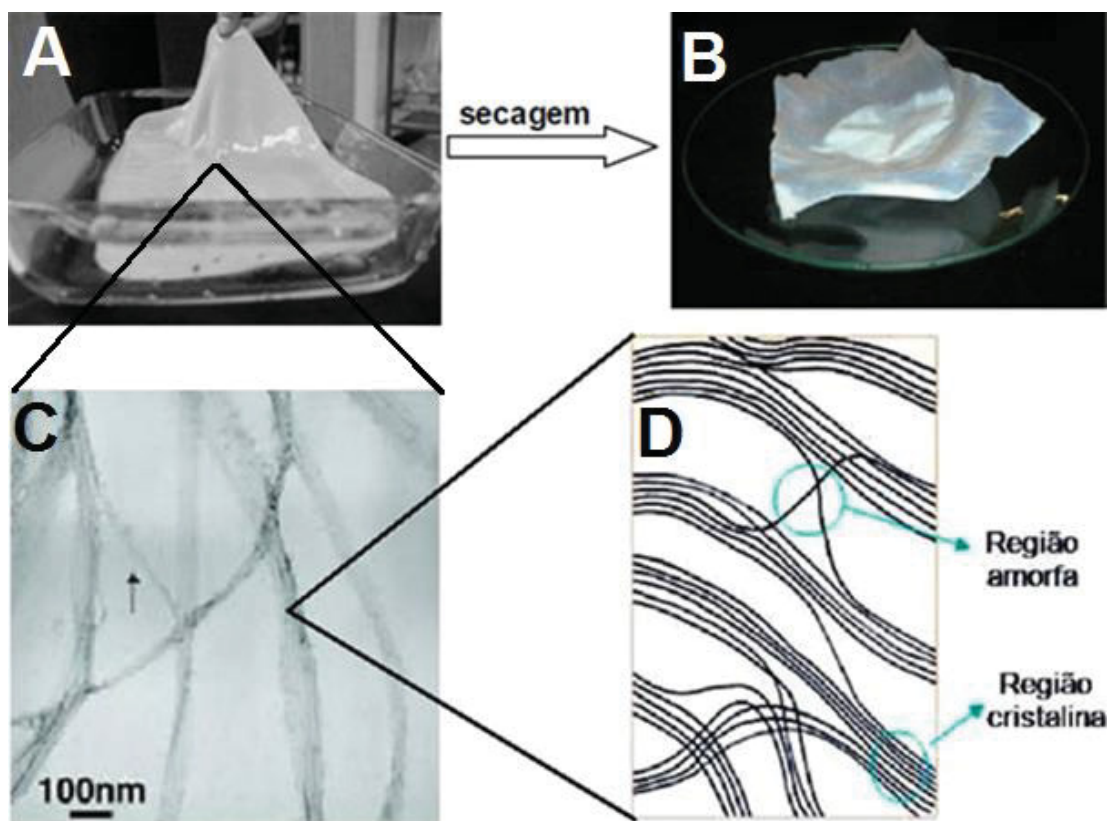


FIGURA 05 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CELULOSE BACTERIANA

FONTE: Adaptado de Iguchi *et al.* (2000)

A) Membrana de celulose bacteriana (CB), B) Membrana de CB após secagem, C) Microfibrilas da CB e D) Ilustração da diferença das regiões amorfa e cristalina nas microfibrilas

De acordo com Koizumi *et al.* (2008), a região amorfa das microfibrilas ocupa aproximadamente 90% do seu volume, entretanto, como o volume da CB é composto de até 99% de água, essa região contribui muito pouco para sua massa.

A grande vantagem da CB é sua obtenção de forma pura, isto é, não se encontra associada a outras macromoléculas como hemiceluloses, lignina e pectina, como ocorre na parede celular de plantas, fungos e alguns tipos de algas; ou envolta por uma camada grossa de cálcio como ocorre nos tunicados. Devido a essas impurezas, a celulose dessas fontes necessita de fortes tratamentos químicos para a sua purificação. Tais tratamentos podem causar danos irreversíveis em sua estrutura (SHEYKHNAZARI *et al.*, 2011). Em relação as suas propriedades físico-químicas a CB também se destaca em relação a outras fontes. Ela possui um elevado DP (16.000 a 20.000), alta cristalinidade (>60%), alta proporção da alomorfia I α (44%), alto conteúdo de água (>99%). Além disso, as películas de CB de acordo com o módulo de elasticidade (Young) possuem valores isotropicamente distribuídos ao longo da superfície entre 16 e 18 GPa, que é extraordinariamente alto para materiais biológicos bidimensionais, e que a torna adequada para reforço de polpas de papel e outras aplicações, como a confecção de diafragmas acústicos para alto-falantes de alta fidelidade. Considerando somente as zonas cristalinas da CB, Hsieh *et al.* (2008) estimaram o módulo elástico das fibrilas de CB em 114 GPa através do espectro de Raman, com a CB relaxada e depois submetendo-a a esforços de tração, utilizando um desvio da banda em 1095 cm⁻¹ (HSIEH *et al.*, 2008).

2.1.2 Melhoramento das propriedades físico-químicas da celulose voltada para a síntese de biocompósitos

Comparativamente, as fibrilas de celulose apresentam um módulo de elasticidade elevado em relação ao de metais como o cobre (110 GPa) e o aço (207 GPa). No entanto, em materiais naturais como a madeira, o módulo de elasticidade é em torno de 10 GPa. Isso significa que, para aproveitar as propriedades mecânicas excepcionais da celulose, há a necessidade de aumentar a cristalinidade, removendo as zonas amorfas. Os fragmentos cristalinos isolados que apresentarem

pelo menos uma de suas dimensões inferiores a 100 nm são denominados como nanocristais de celulose (NC) (SAMIR *et al.*, 2005).

Assim, foram isolados os cristais de várias maneiras, como, pela ação mecânica intensa (ABE *et al.*, 2007), tratamento com ultrassom (TISCHER *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2012), hidrólise ácida (BONDESON *et al.*, 2006) hidrólise enzimática (HAYASHI *et al.*, 2005) e combinações dos métodos anteriores (PÄÄKKÖ *et al.*, 2007). O rompimento da celulose, por meios mecânicos, químicos ou enzimáticos, ocorre preferencialmente nas regiões amorfas. Essa preferência existe, pois as zonas amorfas apresentam menor impedimento estereoquímico e menores forças coesivas de ligações de hidrogênio e van der Waals do que as zonas cristalinas (BATTISTA *et al.*, 1956; MARCHESSAULT *et al.*, 1961).

2.1.3 Aumento da cristalinidade da celulose por tratamento de ultrassom

A energia do ultrassom é transferida para as cadeias de um polímero através de um processo denominado cavitação, o qual consiste na formação, crescimento e colapso violento de cavidades na água. A quantidade de energia provida pela cavitação é aproximadamente 10-100 kJ/mol, que é suficiente para quebrar as ligações de hidrogênio (SUSLICK, 1990; TISCHER *et al.*, 2010).

Trabalhos recentes demonstraram que o tratamento da celulose bacteriana com ultrassom é capaz de promover a reorganização e sua degradação. O ataque se dá preferencialmente nas regiões amorfas e essas uma vez hidrolisadas e reorganizadas, promovem o aumento da cristalinidade do material. Entretanto, comparativamente, a outros métodos com o mesmo objetivo (hidrólises química e enzimática), o tratamento com ultrassom, não aumenta significativamente a cristalinidade (TISCHER *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2012).

O uso de ultrassom na celulose é também utilizado conjuntamente com outros métodos (hidrólises ácida e enzimática) para o aumento da cristalinidade, tanto previamente, para tornar as microfibrilas de celulose mais susceptíveis ao ataque, quanto posteriormente, para melhorar a dispersão dos produtos gerados (BONDESON *et al.*, 2006; TISCHER *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2012).

2.1.4 Obtenção de nanocristais de celulose por hidrólise ácida

Nas hidrólises ácidas para o isolamento dos NC, geralmente, são utilizados os ácidos sulfúrico (H_2SO_4 – 64% m/v) (ARAKI *et al.*, 1999; ROMAN; WINTER, 2004; MAEDA *et al.*, 2007) em maior escala, e, em menor proporção, o ácido clorídrico (HCl – 4 M) (BHATTACHARYA *et al.*, 1991; GEORGE; SIDDARAMAIAH, 2012). A hidrólise ocorre preferencialmente nas zonas amorfas (FIGURA 06-A), devido a razões já descritas (item 2.1.2). O mecanismo é similar para ambos os ácidos (FIGURA 06-B) que quimicamente são fortes, pois em meio aquoso se ionizam rapidamente, liberando prótons, que se ligam rapidamente ao oxigênio glicosídico (caminho 1) ou ao oxigênio cíclico (caminho 2), seguido de quebra da ligação glicosídica pela água (RANBY *et al.*, 1949; MUKHERJEE; WOODS, 1953; BRAUN; DORGAN, 2009; LU; HSIEH, 2010). No caso da hidrólise com ácido sulfúrico, produtos de sua ionização podem continuar reagindo (FIGURA 06-C), causando uma esterificação dos grupos hidroxilas na superfície dos NC, resultando numa adição de carga negativa aos NC (RANBY *et al.*, 1949; LU; HSIEH, 2010). Essa adição de carga gera uma suspensão mais estável do que a tratada com HCl , devido à repulsão eletrostática entre os grupos carregados, porém com estabilidade térmica inferior, sem contar a perda parcial das propriedades nativas da celulose (RANBY *et al.*, 1949; BECK-CANDANEDO *et al.*, 2005; BRAUN; DORGAN, 2009; LU; HSIEH, 2010).

Para que sejam produzidos os NC, as condições da hidrólise (temperatura, tempo de reação, concentração e quantidade do ácido) devem ser ajustadas. Caso contrário, toda a celulose poderá ser hidrolisada em oligossacarídeos ou a celulose não ser hidrolisada suficiente para formar os NC.

A hidrólise ácida possui limitações para isolar os NC, como baixo rendimento ($\pm 50\%$); e a perda da fidelidade da estrutura original feita por modificações como adições de carga a superfície dos NC (BRAUN; DORGAN, 2009; LU; HSIEH, 2010; KLEMM *et al.*, 2011; GEORGE; SIDDARAMAIAH, 2012). A hidrólise enzimática compensa essas limitações. As enzimas utilizadas (endoglucanases) se caracterizam por agirem, geralmente, sobre as zonas amorfas, produzindo uma quebra aleatória das ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) e pouca liberação de açúcares redutores (RAMOS *et al.*, 1992). Embora esse tipo de hidrólise apresente vantagens

sobre a ácida, como maior rendimento e especificidade, ela apresenta um maior custo, o que ainda não é vantajoso industrialmente.

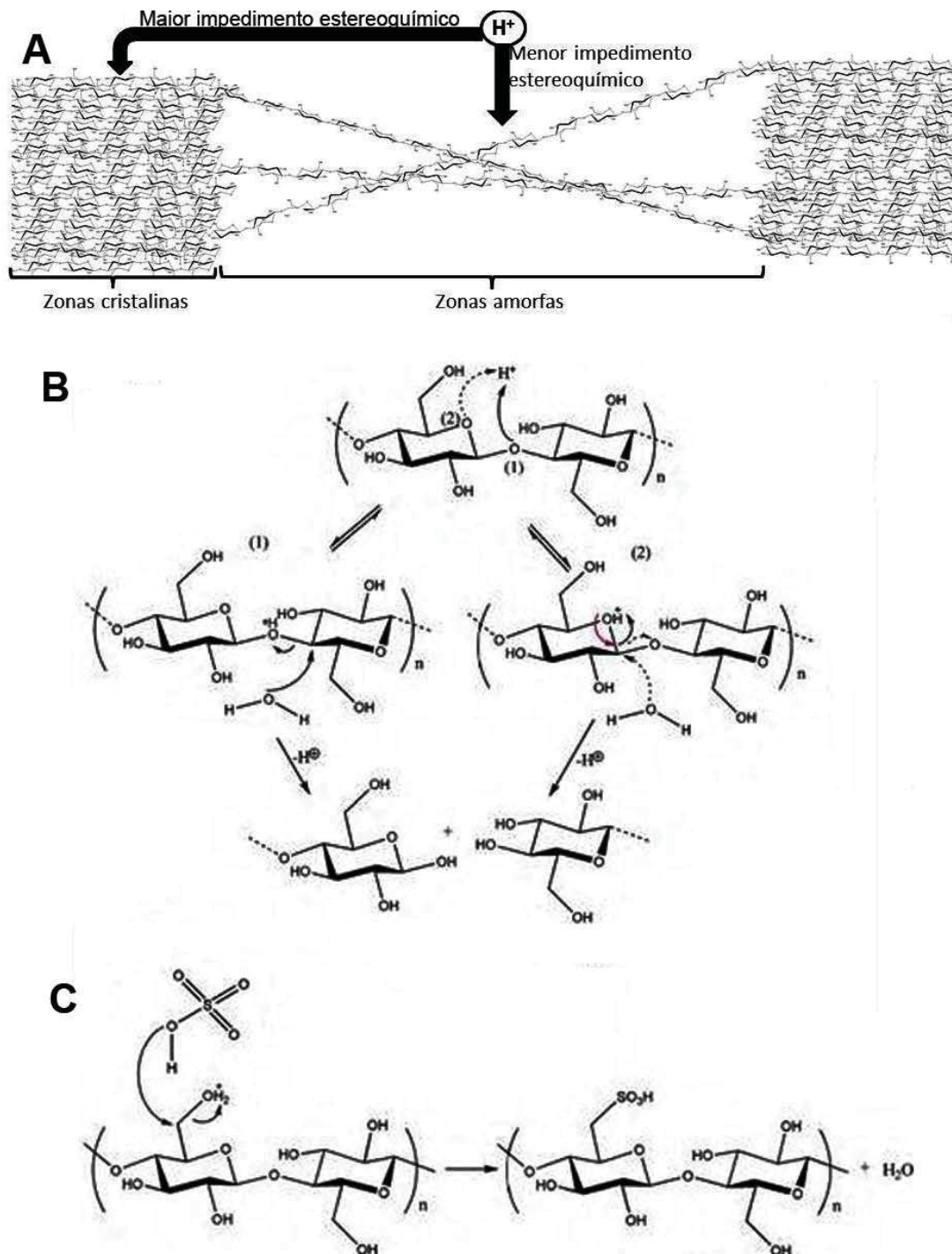


FIGURA 06 – MECANISMO DE HIDRÓLISE DA CELULOSE

FONTE: Adaptado de Lu e Hsieh (2010)

Menor impedimento estereoquímico das regiões amorfas para a reação (A), mecanismo de despolimerização das cadeias (B), e modificação da superfície por produtos da hidrólise com H_2SO_4 (C)

2.2 XILOGLUCANA (XG)

As xiloglucanas (XG) são polissacarídeos encontrados principalmente em vegetais. Apresentam função estrutural e de reserva na parede celular e no endosperma de sementes de plantas mono e dicotiledôneas (HAYASHI *et al.*, 1987), constituindo até 25% em massa (HEINZE, 2005).

Devido as suas propriedades reológicas únicas e por apresentarem baixa toxicidade, as XG têm um grande potencial de uso nas indústrias alimentícias (BHATTACHARYA *et al.*, 1991; MAEDA *et al.*, 2007), farmacêutica, médica e cosmética, entre outras (BURGALASSI *et al.*, 1996; ITOH *et al.*, 2008).

Sua estrutura consiste em uma cadeia principal de glucopiranosos conectadas por ligações β -(1 \rightarrow 4) com ramificações em C-6 por α -D-xilopiranosose. Dependendo da origem da fonte de XG ela ainda pode apresentar mais substituições no C-2 da xilose por β -D-galactopiranosose (FIGURA 07), ou ainda uma terceira substituição no C-2 da galactose por β -D-fucopiranosose (MCNEIL *et al.*, 1984; FRY, 1989; HAYASHI, 1989), ou outras combinações gerando estruturas mais complexas (YORK *et al.*, 1996; HANTUS *et al.*, 1997; JIA *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2005). As ramificações presentes nesse polissacarídeo, provavelmente, contribuem para sua solubilidade e controlam potencialmente a sua flexibilidade conformacional (O'NEILL *et al.*, 1989; HAYASHI *et al.*, 1994; FREITAS *et al.*, 2011).

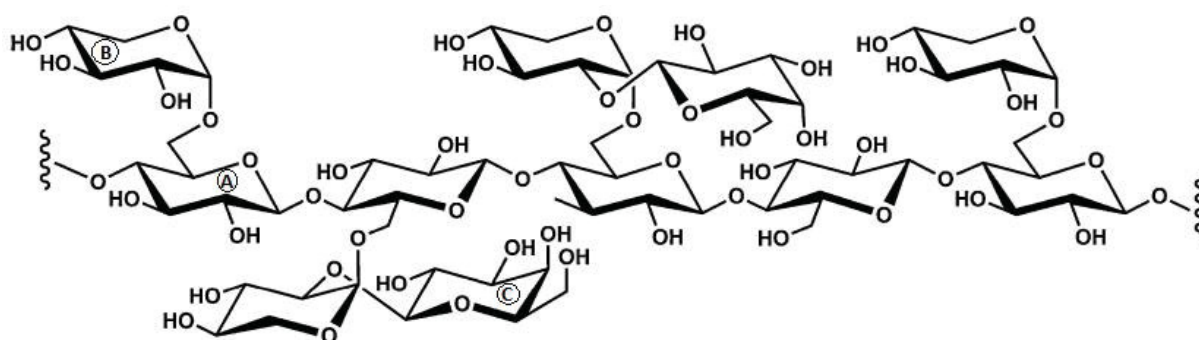


FIGURA 07 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA XILOGLUCANA DE SEMENTES DE TAMARINDO

FONTE: Adaptado de Eronen *et al.* (2011)

Unidades de glicose (A), xilose (B) e galactose (C)

As XG de reserva na parede celular vegetal se acumulam predominantemente nos tecidos dos cotilédones de algumas espécies de vegetais como tamarindo (*Tamarindus indica*) (KOOIMAN, 1960), jatobá (*Hymenaea courbaril*) (KOOIMAN, 1960; LIMA *et al.*, 1993; LIMA *et al.*, 1995; FREITAS *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2011), afzelia, (*Afzelia africana*) (REN *et al.*, 2005), jojoba (*Simmondsia chinensis*) (HANTUS *et al.*, 1997), jatobá mirim (*Guilbortia hymenifolia*) (LUCYSZYN *et al.*, 2011), e copaíba (*Copaifera langsdorfii*) (BUCKERIDGE *et al.*, 1992; STUPP *et al.*, 2008). Entretanto, a principal fonte explorada comercialmente é a de sementes de tamarindo, que é muito utilizada em alimentos em países como o Japão (MICHAEL; REID, 2006), sendo também a mais estudada.

2.2.1 Xiloglucana de *Tamarindus indica*

O *Tamarindus indica* é popularmente conhecido como tamarindo e é classificado botanicamente de acordo com a FIGURA 08.



FIGURA 08 – CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DE *T. indica* E ILUSTRAÇÃO DAS PARTES DAS PLANTAS

FONTE: (RAINTREE, 2012)

A) Árvore e tronco. B) Flores, C) Flores, D) Vagens

Tem origem das savanas africanas, embora seja mais cultivado atualmente na Índia, as XGs das sementes dessa planta são utilizadas, principalmente, nas indústrias têxteis e alimentícias, e ainda como adesivo e agente emulsificante, em cosméticos, para preparar emulsões de óleos essenciais, cremes de barbear e

dentifrícios, em produtos farmacêuticos, como ligantes em comprimidos e drágeas, em inseticidas, para emulsificar princípios ativos e óleos minerais. Por possuir muitas propriedades similares às pectinas, é usada em tratamento de colite, diarreia, disenteria e outras desordens intestinais (RAO, 1973).

2.3 INTERAÇÃO ENTRE XILOGLUCANA E CELULOSE

Dada a similaridade entre a estrutura química da XG e da celulose, foi sugerido que a interação XG-celulose está envolvida no alinhamento das cadeias desses polissacarídeos (LIMA; BUCKERIDGE, 2001). De fato, novos modelos moleculares suportaram essa hipótese, embora alguns estudos tenham divergido se a interação intercadeia era mediada pelo anel das unidades de glucose ou pelo empilhamento de ligações de hidrogênio (FINKENSTADT *et al.*, 1995; MICHAEL; REID, 2006). Alguns autores usando modelos computacionais e testes de adsorção sugeriram que a presença de unidades de fucose na XG determina a sua conformação planar e que essa propriedade estaria relacionada com a afinidade dela com a celulose. Substituições por galactomananas em altas quantidades também demonstraram alterar essa interação (FINKENSTADT *et al.*, 1995; SHIRAKAWA *et al.*, 1998; JEAN *et al.*, 2008; KÜMMERER *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011).

Lima, Loh e Buckeridge (2004) testaram a adsorção de diferentes oligossacarídeos de XGs (com e sem fucose) com diferentes massas molares em celulose microcristalina (semelhante aos NC, porém com tamanhos a partir de 1 μm) demonstrando que a capacidade de interação depende não somente das unidades das cadeias laterais, mas, também, da massa molar da XG. Sendo que, quanto menor a massa molar da XG, maior foi a interação com a celulose microcristalina. Cerclier *et al.* (2010) em testes de adsorção de XG em NC por automontagem (*Layer by Layer* – LBL), demonstraram que a adsorção de XG ocorre melhor em concentrações elevadas ($\geq 1\text{mg.mL}^{-1}$), devido à forma entrelaçada que esse polímero se encontra, porém ocasionando camadas muito heterogêneas e menos estáveis (FIGURA 09).

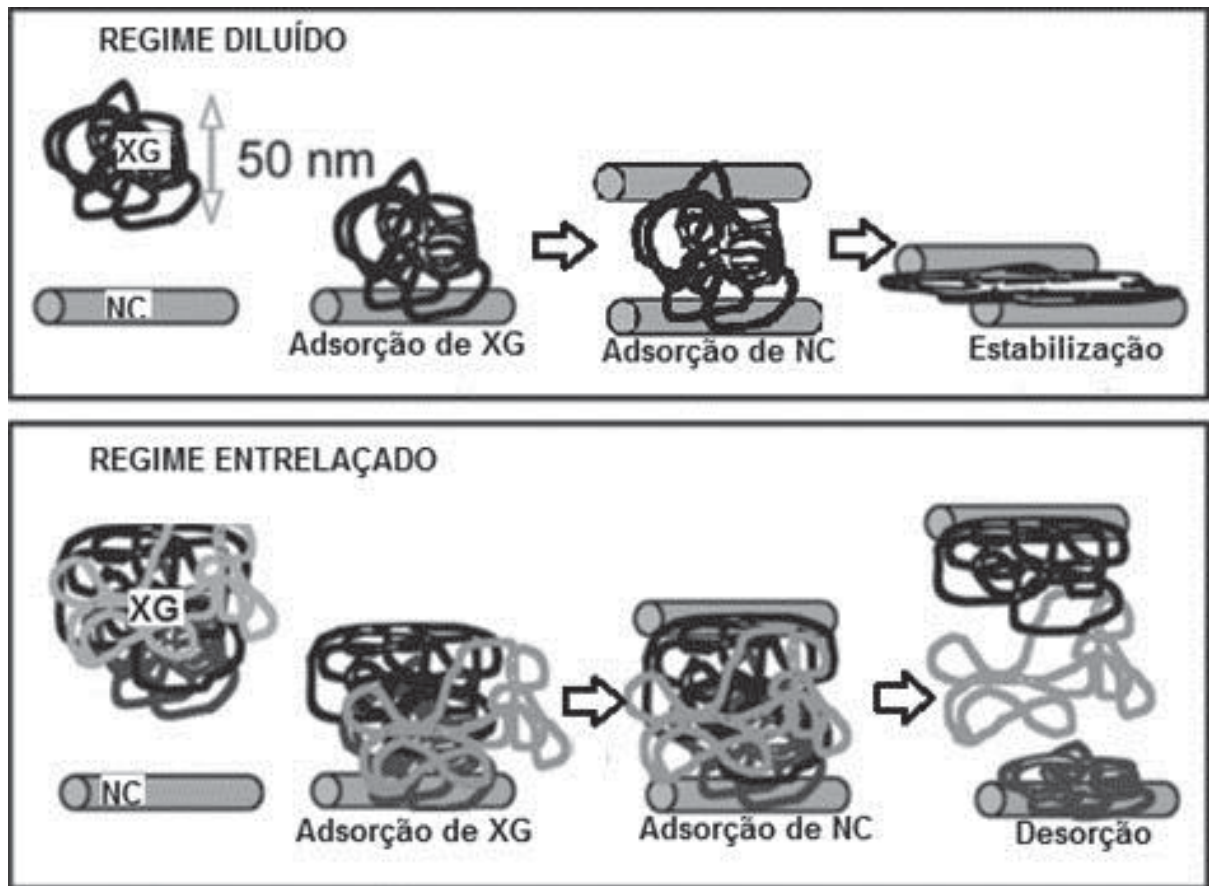


FIGURA 09 – ESQUEMA DE ADSORÇÃO DE XILOGLUCANA (XG) EM NANOCRISTAIS DE CELULOSE (NC)

FONTE: (CERCLIER *et al.*, 2010)

Diferença da concentração de XG na estabilização entre as camadas depositadas em A) regime diluído e B) regime entrelaçado

Bionanocompósitos na forma de filmes com microfibrilas de membrana de celulose bacteriana úmida e processada por agitação mecânica, com a incorporação de xiloglucana de tamarindo (XGT) foram desenvolvidos, recentemente, por de Souza *et al.* (2013) observando-se uma boa homogeneidade e melhoria do módulo de Young e das propriedades térmicas com a incorporação de 10% de XGT.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

A celulose bacteriana (CB), sintetizada por cepas de *Acetobacter xylinum*, foi fornecida pela Membracel Produtos Tecnológicos Ltda., empresa com sede em Almirante Tamandaré, PR. As amostras de celulose foram recebidas na forma de aparas (restos de cortes) secas. Segundo o fabricante, após a fermentação/produção de membranas o material passa por um processo de lavagem em solução diluída de hidróxido de sódio para eliminação das bactérias, seguido de branqueamento com hipoclorito, lavagem até a neutralização, secagem e cortes.

A amostra de xiloglucana (XG) utilizada neste trabalho foi proveniente de uma amostra comercial de pó de sementes de *T. indica* (*Tamarind kernel powder* - TKP), cedida como doação pela empresa Balasanka Mills da Índia; e foi a mesma utilizada e caracterizada na dissertação de mestrado desenvolvida por Jó (2009).

Para os ensaios de hidrólise da CB para obtenção de nanocristais de celulose bacteriana (NCB) foram utilizados H_2SO_4 (95-98% m/m - Sigma Aldrich), HCl (37% m/m- Merck), CH_2O_2 (Dinâmica – 99%), H_2O_2 (Vetec - 35% m/m) e ácido ascórbico (99% grau de pureza - Quimidrol). Polietilenimina (PEI) (Polymine® SNA) foi usado como substrato para os ensaios de automontagem (*layer by layer* – LBL). Para as análises de difratometria de raios-x foi utilizado álcool terc-butilico (marca e pureza). Água purificada (MilliQ System, 18.2 MΩcm) foi usada sem ajustes de pH para preparar soluções aquosa de CB, NCB, XG e PEI.

3.2 PRÉ-TRATAMENTO DA CELULOSE BACTERIANA PARA AS REAÇÕES DE HIDRÓLISE

3.2.1 Processamento da celulose bacteriana com moinho

As aparas das membranas de CB foram desfragmentadas com auxílio de uma tesoura e logo após foram suspensas em água purificada (3g.L^{-1}). A suspensão foi triturada com auxílio de um mixer (PHILIPS Wallita) por 20 min. Posteriormente, a amostra foi processada no moinho Supermasscolloider (Masuko Sangyo MKCA6-2), com abertura entre os discos de $1\text{ }\mu\text{m}$. Esse ensaio foi possível com a colaboração da Profa. Dra. Graciela I. B. de Muniz, do curso de Pós-Graduação em Eng. Florestal da UFPR.

3.2.2 Processamento da celulose bacteriana por ultrasonicação

Após o processamento no moinho a suspensão de CB em água foi ultrassonicada em aparelho da Sonics (Vibra-Cell VC-505, Sonics & Materials Inc., sonda, 630-0209) por 60 min. Após foi adicionado azida sódica (200 mg.L^{-1}) para conservação e, a CB processada com moinho e ultrassom (CBp) foi mantida a 4°C , até a utilização.

3.2.3 Determinação do teor de matéria seca da celulose processada

A determinação da concentração da suspensão da CBp foi determinada adicionando-se um volume conhecido a um cadinho feito com papel alumínio previamente tarado, e colocando-a em estufa aquecida a 105°C por duas horas. A amostra foi então resfriada em dessecador a vácuo e pesada. A operação foi repetida até massa constante. A massa seca é a diferença entre a massa final e a massa inicial do cadinho vazio, expressa em gramas no volume inicial adicionado.

3.3 TÉCNICAS DE OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DE CRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA

3.3.1 Hidrólise radicalar

A hidrólise radicalar foi realizada com metodologia adaptada de Narrainen e Lovell (2010). A suspensão de CBp (1g.L^{-1}) foi colocada em um balão de 3 bocas equipado com um condensador, e aquecida em banho de óleo a 80°C . Para remoção de oxigênio que poderia, eventualmente, atrapalhar na etapa de propagação radicalar, a solução foi previamente purgada com nitrogênio gasoso (N_2), durante 15 min, antes do processo de degradação radicalar. Posteriormente, foi adicionada solução de ácido ascórbico e imediatamente o peróxido de hidrogênio (35%) tendo concentrações finais em solução de $65,6\text{ mmol.L}^{-1}$ e $117,6\text{ mmol.L}^{-1}$ (concentrações quatro vezes mais alta do que da literatura). Foram utilizados diferentes tempos (30 a 480 min) e diferentes proporções dos reagentes utilizados (1- 32x). A hidrólise foi interrompida, por resfriamento da solução em banho de gelo, com adição de 1 mg.mL^{-1} de hidroquinona. A solução foi então centrifugada ($10.000\text{ g} - 10\text{min} - 4^{\circ}\text{C}$). O precipitado obtido foi resuspenso em água purificada (MilliQ System, $18.2\text{ M}\Omega\text{cm}$) e recentrifugado nessas condições por dez vezes. Para remoção de vestígios restantes de reagentes utilizados, foi realizada a diálise contra água purificada (MilliQ System, $18.2\text{ M}\Omega\text{ cm}$) por sete dias. A amostra então foi armazenada a 4°C com azida (200 mg.L^{-1}), para posterior análise.

3.3.2 Hidrólise com ácido fórmico

A solução de CBp (1g.L^{-1}) foi adicionada a um balão de vidro equipado com um condensador, sob banho de óleo a 100°C . Foi adicionado então CH_2O_2 (99%) até que sua concentração final na solução fosse de 90%. O tempo total de hidrólise foi de 9 horas, sendo retirada aliquotas de 100 mL em intervalos de tempos distintos. Após esse tempo, a hidrólise foi interrompida por resfriamento em banho de gelo. Os ácidos foram removidos com extensa centrifugação (cada ciclo: 15 min – $4\,000\text{ g}$)

contra água purificada (MilliQ System, 18.2 MΩ cm), até pH>5 (IBRAHIM *et al.*, 2010). Para remoção de vestígios restantes de ácidos e oligossacarídeos, foi feita a diálise contra água purificada (MilliQ System, 18.2 MΩ cm) até que a condutividade da água de fora da membrana ficasse semelhante a da água purificada. A amostra foi armazenada a 4°C com azida sódica (200 mg.L⁻¹) até o uso.

3.3.3 Hidrólises com ácido clorídrico e ácido sulfúrico

A hidrólise ácida da CBp com HCl (4 mol.L⁻¹ a 70°C) foi realizada de acordo com George e Siddaramaiah (2012), e a com H₂SO₄ (5,2 mol.L⁻¹ a 50°C) de acordo com Maeda *et al.* (2007). Nos dois procedimentos a solução de CBp (1 g.L⁻¹) foi hidrolisada por 120 min em um balão de vidro acoplado a um condensador, sob constante agitação em um banho de óleo. O tempo da hidrólise com HCl foi dividido em duas etapas, na qual após os primeiros 60 min a amostra foi centrifugada e ressuspendida em nova solução de HCl 4 mol.L⁻¹ a 70°C, para ser novamente hidrolisada por mais 60 min, nas mesmas condições anteriores. A interrupção e o armazenamento das soluções resultantes dessas hidrólises foram feitas igualmente à efetuada no item 3.3.2.

3.3.4 Hidrólise com uma mistura de ácidos clorídrico e sulfúrico (Hbd)

A CBp (1g.L⁻¹) foi hidrolisada por 120 min em uma solução aquecida (60°C) sob banho de óleo, contendo uma mistura de água purificada: HCl (37% - Merck): H₂SO₄ (95-98% - Sigma Aldrich) na proporção de 6:3:1 (v/v), sob constante agitação, em um balão de vidro com boca esmerilhada acoplado a um condensador. Essa hidrólise da mistura desses dois ácidos foi denominada neste trabalho como hidrólise híbrida (Hbd).

A interrupção e o armazenamento das soluções resultantes dessas hidrólises foram feitas igualmente à efetuada no item 3.3.2.

3.4 CARACTERIZAÇÕES DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) E DE NANOCOMPÓSITOS REVESTIDOS COM XILOGLUCANA (XG)

3.4.1 Granulometria a laser

Os ensaios granulométricos por laser das amostras de CB hidrolisadas foram realizados com o uso do Granulômetro CILAS 1064, com a colaboração do Prof. Dr. José Manuel dos Reis Neto, LAMIR, UFPR. Esse ensaio permite determinar a distribuição granulométrica do material analisado com granulometria variando de 0,04 até 500 μm . As medições de tamanho foram realizadas baseando-se na difração Fraunhofer, que é feita pela detecção do ângulo de difração de um feixe de luz que atravessa uma população de amostras contidas em uma célula ótica. Para homogeneização da leitura das amostras, foi utilizada a massa completa dos hidrolisados. Essa massa foi então injetada no equipamento (10 mg.mL^{-1}). As medidas da adsorção da xiloglucana sobre nanocristais de celulose bacteriana foram avaliadas pela isoterma de Langmuir.

Diferentes dispersões de XG foram adicionadas a dispersões de NCB, resultando em diferentes concentrações de XG ($50 - 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e uma concentração fixa de NCB (1 mg.mL^{-1}) na dispersão final. As soluções foram incubadas a 25°C , por 30 min. Após esse tempo as blendas foram centrifugadas (30 min – 13 000 g) e a quantidade de XG não adsorvida presente no sobrenadante foi quantificada pelo método I_2/KI (KOOIMAN, 1960), no qual para a curva padrão de XG, essas também foram pré-centrifugadas nas mesmas condições anteriores (LIMA; BUCKERIDGE, 2001; LIMA *et al.*, 2004).

A quantidade de XG adsorvida sobre o NCB (Q_e) foi calculada entre a diferença da quantidade inicial de XG adicionada (C_0) e a quantidade de XG presente no sobrenadante após a centrifugação (C_e) (Equação 1):

$$Q_e = C_0 - C_e \quad (1)$$

Ensaio de adsorção foram realizados em triplicata e os resultados foram ajustados utilizando a linearização da equação de Langmuir de acordo com a seguinte equação (Equação 2):

$$\frac{C_e}{Q_e} = \frac{1}{Q_{max} K} + \frac{C_e}{Q_{max}} \quad (2)$$

onde, Q_{max} e K são a capacidade de adsorção máxima e a energia de adsorção, respectivamente. Um gráfico de C_e/Q_e versus C_e fornece como coeficiente linear $1/Q_{max}K$ e como coeficiente angular $1/Q_{max}$ (LOPEZ *et al.*, 2010).

3.4.2 Medidas da adsorção da xiloglucana sobre nanocristais de celulose bacteriana avaliadas pelo potencial zeta ($p\zeta$)

As medidas de potencial zeta ($p\zeta$) e de tamanho de partícula foram efetuadas no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) (Instituto Cérebro-Hospital Israelita Albert Einstein), que se baseia na técnica LDV (Laser Doppler Velocimetry). As soluções de XG e NCB foram preparadas na concentração de 1 mg.mL^{-1} .

A interação entre XG e NCB foram avaliadas com uma concentração fixa de NCB (1 mg.mL^{-1}) e variando a concentração de XG ($25\text{-}200 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). Foi calculada a dependência da concentração de XG em função do $p\zeta$ pela seguinte expressão (Equação 3):

$$p\zeta = K.C^a \quad (3)$$

onde K é uma constante, C é a concentração e a é a dependência da concentração da XG em função do $p\zeta$.

Para as medidas foi utilizada uma cubeta DTS 1060C (clear disposable zeta-cell), na temperatura de 25°C. As amostras foram estabilizadas dentro do equipamento durante 30 segundos e foram efetuadas 100 médias do valor obtido do potencial zeta.

3.4.3 Medidas da adsorção da xiloglucana sobre nanocristais de celulose bacteriana avaliadas pelo espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A média do diâmetro hidrodinâmico aparente das amostras de NCB, XG e da mistura NCB-XG foi determinada usando o equipamento nanoDLS Brookhaven Instruments a um ângulo fixo de 90°. As medidas a 632,8 nm foram obtidas usando um laser de He-Ne de estado sólido 15 mW. As condições de incubação de BCN+XG foi a mesma realizada na isoterma de Langmuir (item 3.4.2) e, após isso, a mistura foi armazenada a 4°C até utilização. Os resultados foram avaliados pelo software DLS (Brookhaven Instruments) pelo método de CONTIN, o qual caracteriza a distribuição das partículas usando parâmetros estatísticos. O método de CONTIN fita uma curva multiexponencial para a função de correlação do tempo. Todas as medidas foram realizadas a 25° C e em triplicata.

A medida da intensidade da função de auto correlação com o tempo da intensidade da luz espalhada pode ser correlacionada com a equação de Stokes-Einstein (Equação 4):

$$D = \frac{K_b T}{6\pi\eta R_h} \quad (4)$$

onde D é a difusividade do NCB no solvente, R_h é o raio hidrodinâmico aparente do NCB, K_b é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta em Kelvin e η é a viscosidade do solvente (BERNE; PECORA, 1976).

3.4.4 Avaliação do índice de cristalinidade da celulose bacteriana e seus nanocristais através de difratometria de raios-X (DRX)

A fim de verificar possíveis mudanças de cristalinidade e organização cristalina dos cristalitos de celulose, foram obtidos difratogramas de raios-X da CBp e dos NCB.

Para evitar a recristalização das cadeias de celulose durante o procedimento de secagem, o que pode levar a estimativas exageradas de cristalinidade, o solvente foi substituído por álcool terc-butílico, seguido de liofilização (RAMOS *et al.*, 1992). Para isso as amostras foram centrifugadas (20 min – 10 000 g), resuspendendo e homogeneizando o precipitado formado (150 mg.mL⁻¹) com concentrações crescentes de álcool terc-butílico (30, 50, 70, 90, 100%). As amostras foram então liofilizadas e comprimidas em porta amostras de alumínio.

Os difratogramas foram obtidos com radiação de Cu K α (λ = 0,15418 nm), 40 kV e 30 mA, velocidade de varredura 0,5°.min⁻¹), em equipamento Shimadzu XRD 6000. A cristalinidade das amostras de celulose foi obtida pelo método proposto por Chen *et al.* (2007). Cinco picos de difração relacionados à rede cristalina da celulose I e um pico largo, centrado próximo a 2θ = 18,5°, relacionado ao halo amorfo, foram ajustados aos difratogramas utilizando-se o ajuste gaussiano de picos do software Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). O índice de cristalinidade (IC) foi calculado pela expressão (Equação 5):

$$IC = \frac{A_t - A_{am}}{A_t} \quad (5)$$

onde A_t é a área total e A_m é a área do amorfo.

Os picos obtidos e os ajustes foram também utilizados para estimar as dimensões aparentes dos cristalitos de celulose (DAC), conforme indexados por Elazzouzi-Hafraoui *et al.* (2007) , utilizando-se a Equação de Scherrer (Equação 6):

$$DAC = \frac{0,9 \lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta} \quad (6)$$

onde λ é o comprimento de onda da radiação em nm, $\beta_{1/2}$ é a largura do pico a meia altura em radianos e θ é o ângulo de difração. O fator de forma 0,9 é válido para partículas esféricas, no entanto, como os resultados foram utilizados apenas de forma comparativa, isso não representa um problema.

O espaçamento entre os planos cristalinos foram determinados usando a lei de Bragg (Equação 7):

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \quad (7)$$

onde θ é o ângulo entre o plano e o difratado ou raio incidente e λ é o comprimento de onda da radiação em nm.

3.4.5 Preparo das amostras e análises por microscopia de força atômica (MFA)

Com o objetivo de medir as variações das dimensões através da adsorção de XG em NCB as amostras foram depositadas por revestimento rotacional (*spin coating*) em superfícies de mica limpas e avaliadas ao ar em modo *tapping*.

A adsorção de XG em NCB utilizando a técnica de automontagem (*Layer by Layer* – LBL) foi realizada por deposição por imersão (*dipping*). Primeiramente, soluções de polietilenimina (PEI) (1 mg.mL^{-1}) seguida de NCB (1 mg.mL^{-1}) foram depositadas na superfície de mica por *spin coating* (2 min – 3000 rpm). Após, foi realizada a deposição de camadas alternadas de XG e NCB por *dipping* com intercalação de lavagens com água purificada. As imagens das camadas de PEI, NCB e XG foram então obtidas em célula líquida contendo água ultra purificada em

modo de contato intermitente com uma oscilação de frequência de $\sim 100\text{kHz}$. As imagens de MFA foram obtidas em um microscópio Agilent 5500 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) usando cantilever de silício Mikromasch NSC14 (Mikromasch USA, San Jose, CA, USA) com nominal spring de $5,7\text{ Nm}^{-1}$, frequência de ressonância de $\sim 170\text{kHz}$ e o escaneamento foi feito em 2.0×2.0 , 4.0×4.0 e $8.0 \times 8.0\text{ }\mu\text{m}$. As imagens foram adquiridas usando o software Pico View (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e processadas com o software Gwyddion (Czech Metrology Institute).

3.4.6 Acompanhamento do crescimento de nanofilmes multicamadas através da microbalança de cristal de quartzo

O acompanhamento do crescimento dos filmes foi feito em triplicata pela técnica da alteração de frequência em microbalança de cristal de quartzo (MCQ) modelo SRS da empresa Stanford Research Systems. Sobre o cristal de quartzo, recoberto de ouro, em que é feita a deposição da solução dos polímeros no equipamento, foi depositado por *spin coating* (2 min – 3000 rpm) uma camada de solução de PEI (1 mg.mL^{-1}), seguida de uma camada de NCB (1 mg.mL^{-1}), com a finalidade de formar um substrato ideal para acompanhar o crescimento das multicamadas durante o experimento. Esse cristal foi então colocado na célula de análise (SRS) da MCQ e, foram injetadas soluções de NCB e XG (1 mg.mL^{-1}), alternadamente. A primeira camada injetada foi a de XG. Após o equilíbrio do sistema, foi realizado o procedimento de lavagem para retirar o excesso de solução, injetando água purificada. Então foi injetada a solução de NCB (1 mg.mL^{-1}) até atingir o equilíbrio do sistema, seguido de lavagem até obter novamente o equilíbrio. O ciclo foi repetido até atingir o número de camadas desejadas.

O cristal de quartzo recoberto com ouro onde foi crescido o filme foi excitado a uma frequência de 5 mHz. O experimento da MCQ foi realizado em célula de fluxo (SRS) conectada com uma bomba peristáltica e a uma seringa, com uma taxa de fluxo de $100\text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$. Soluções de NCB e XG (1 mg.mL^{-1}) foram injetadas imediatamente, sendo realizadas lavagens com água purificada entre cada injeção. O equipamento pode ser utilizado através da REDE Nanobiotec (CAPES).

3.4.7 Acompanhamento do crescimento de filmes multicamadas através de elipsometria

A elipsometria foi realizada no laboratório IQ/USP-SP com a colaboração da Profa. Dra. Denise F.S. Petri. As medidas foram realizadas em ar usando um elipsômetro DRE-EL02 (Ratzeburg, Alemanha) equipado com um laser He-Ne ($\lambda=632,8$ nm), com um ângulo de incidência ajustado em 70° . Para interpretação dos resultados um modelo de multicamadas composto do substrato, da camada desconhecida, e do meio circundante foi utilizado. A espessura (d_x) e o índice de refração (n_x) para a camada desconhecida foram calculados a partir dos ângulos elipsométricos, Δ e ψ , usando a equação elipsométrica fundamental e os cálculos iterativos através de matrizes de Jones (AZZAM; BASHARA, 1987) (equação 7):

$$e^{i\Delta} \cdot \tan \psi = \frac{R_p}{R_s} = f(\eta, d_x, \lambda, \phi) \quad (7)$$

onde, R_p e R_s , respectivamente, são os coeficientes globais de reflexão para as ondas paralelas e perpendiculares. Eles são função do ângulo de incidência (ϕ), do comprimento de onda (λ) da radiação e do índice de refração (η) e da espessura de cada modelo de camada (d_x).

A partir dos ângulos elipsométricos, Δ e ψ e pelo modelo de multicamada composto pelo silício, dióxido de silício, camada de polissacarídeo e o ar, é possível determinar a espessura da camada de polissacarídeo. A espessura da camada de dióxido de silício foi determinada em ar, assumindo um índice de refração de $3,88-0,018i$ e espessura infinita para o silício (PALIK, 1985). O índice de refração do meio circundante (ar) foi utilizado como 1,00. Devido à camada de dióxido de silício ser muito fina, o índice de refração foi de 1,462 (PALIK, 1985) para o cálculo da espessura. A média da espessura do dióxido de silício foi de $2,0 \pm 0,2$ nm. Após determinar a espessura da camada de dióxido de silício, a média da espessura das camadas adsorvidas de PEI, NCB e XG foram calculadas em ar através das medidas de elipsometria, considerando para esses cálculos os índices de refração do PEI de $\eta=1,46$ (IZQUIERDO *et al.*, 2005), NCB de $\eta=1,60$ (NOGI; YANO, 2008) e XG de $\eta=1,50$ (BRANDRUP; IMMERGUT, 1966; PEREIRA *et al.*, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROCESSAMENTO

Com o objetivo de facilitar a hidrólise da celulose bacteriana (CB), a área superficial da amostra foi aumentada através de seu processamento com moinho seguido de tratamento com ultrassom.

4.2 ESCOLHA DO MÉTODO DE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB)

Inicialmente, foram avaliadas novas alternativas de hidrolisar as ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) da celulose bacteriana, a fim de gerar diferentes NCB, que poderiam ter melhor adsorção com a XG. Foram efetuadas as hidrólises por radical livre e por ácido fórmico. Entretanto, esses métodos não foram eficientes para produção dos NC. Optou-se então por realizar as hidrólises convencionais utilizando HCl, H₂SO₄ e uma mistura desses dois ácidos (Hbd).

4.2.1 Hidrólise radicalar

A escolha da hidrólise radicalar (inérita em literatura com o objetivo de obter nanocristais de celulose) se baseou nos resultados de Narrainen e Lovell (2010), que obtiveram uma perceptível redução na massa molar numérica da XG, de 250 kg.mol⁻¹ para até 2 kg.mol⁻¹, utilizando radical ascorbila (obtido pela mistura de ácido ascórbico com peróxido de hidrogênio). O mecanismo proposto por estes autores sugere a quebra das ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) das unidades de *D*-glucopiranoose da XG através do ataque pelo radical ascorbila. Como a estrutura química da celulose é semelhante à cadeia principal da XG, nesse sítio da hidrólise

radicalar, esperava-se que os mecanismos da reação funcionassem semelhantemente.

Nesse método o tempo ótimo de hidrólise obtido foi de 60 min na proporção inicial utilizada (item 3.3.1) (FIGURA 10-A). E, com proporções de dezesseis vezes ao do método inicialmente proposto por Narrainen e Lovel (2010), foi obtido um ponto saturante. Não foi observada maior redução de tamanho dos NCBs, em proporções de até trinta e duas vezes a massa inicial de celulose (FIGURA 10-B).

Entretanto, como é possível observar pelas diferenças no perfil de distribuição dos diâmetros, mesmo nessas condições ótimas, a hidrólise radicalar é menos eficiente do que as hidrólises de HCl e H₂SO₄. Além disso, esse método não foi eficiente para isolar os NCB da massa total. Com base nesses resultados, concluiu-se que a hidrólise radicalar se mostrou ineficiente para isolar os NCB.

Assim, é possível que a hidrólise por via radicalar não tenha sido tão eficiente para a celulose como foi com a XG (NARRAINEN; LOVELL, 2010), especialmente, por motivos de diferença de solubilidade entre esses dois biopolímeros. A XG, devido a substituintes em suas ramificações, é hidrossolúvel, o que poderia tornar suas ligações glicosídicas mais susceptíveis estereoquimicamente aos ataques pelos radicais ascorbila formados.

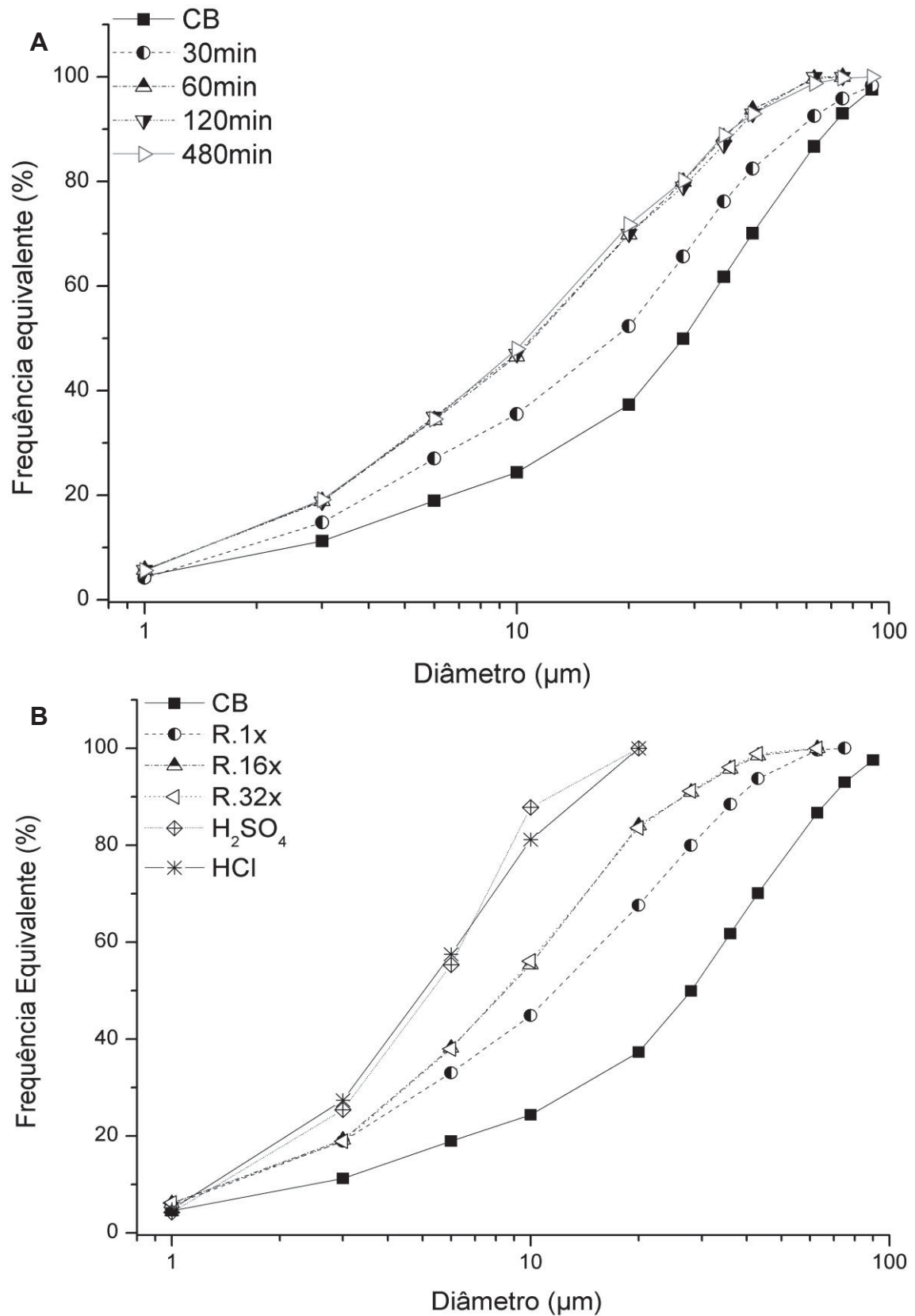


FIGURA 10 – GRANULOMETRIA A LASER DA COMPARAÇÃO DA MASSA TOTAL DA HIDRÓLISE DA CELULOSE BACTERIANA POR VIA RADICALAR VS HCl E H₂SO₄
 Sendo CBp a amostra não hidrolisada. A) Hidrólises radicalar com variação de tempo. B) Hidrólises radicalar de 60 min com variação das proporções dos reagentes utilizados e hidrólises com H₂SO₄ e HCl (120 min)

4.2.2 Hidrólise com ácido fórmico

Assim como na hidrólise radicalar, a hidrólise com ácido fórmico não foi observada a formação de sobrenadante turbido após as centrifugações. As análises de granulometria a laser demonstraram que somente após 9 horas foi obtido um resultado semelhante às hidrólises usuais de HCl e H_2SO_4 atingidos com 120 min (FIGURA 11). Entretanto, essa metodologia também foi descartada, devido a não ser eficiente para isolar os NCB do hidrolisado total, necessitando de um maior tempo de reação e, portanto, com maior custo do que as hidrólises usuais.

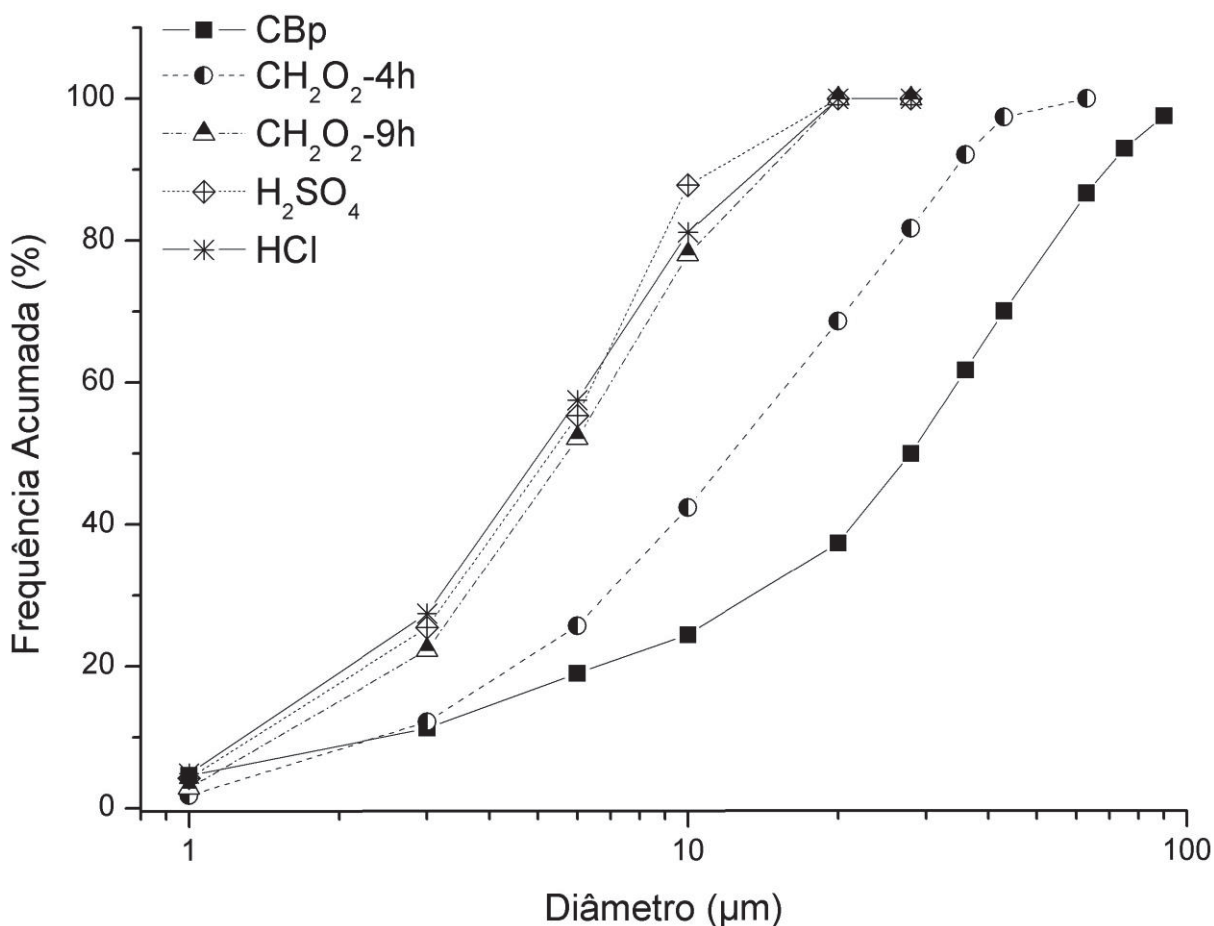


FIGURA 11 – GRANULOMETRIA A LASER DA COMPARAÇÃO DA MASSA TOTAL DA HIDRÓLISE DA CELULOSE BACTERIANA COM CH_2O_2 (4 À 9H) VS HCl E H_2SO_4 (120 MIN)

4.2.3 Obtenção e caracterização dos NCB isolados as com ashidrólises por HCl, H₂SO₄ e Hbd

As hidrólises da celulose realizadas com H₂SO₄ provocaram modificações na superfícies dos NCB isolados, ocasionadas pela introdução de grupamentos sulfatos. Ao elevar o pH do meio (pH>5), esses grupos adquirem carga negativa que geram repulsão eletrostática entre si, dando aos NCBs alta estabilidade no meio. Já os NCB isolados através de tratamento com HCl, são mais fiéis a estrutura nativa da celulose. Entretanto, devido a ausência de cargas na superfície, eles apresentaram alta agregação (LU; HSIEH, 2010; WINTER *et al.*, 2010).

Alguns autores, utilizando uma hidrólise feita pela mistura de H₂SO₄ e HCl para isolar os NC, conseguiram uma diminuição da quantidade de grupos sulfatos introduzidos em sua superfície, devido a menor quantidade de H₂SO₄ utilizada. Esses cristais têm a vantagem de conservar a estabilidade em solução e, também, possuem uma maior estabilidade térmica do que aqueles produzidos e isolados utilizando somente o H₂SO₄ (WANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007).

Com o objetivo de comparar a influência do grau de sulfatação na superfície dos NCBs na interação com XG, foram isolados NCBs por esses três tipos de hidrólises, ou seja por H₂SO₄ (NCB-H₂SO₄), HCl (NCB-HCl) e pela mistura de H₂SO₄ e HCl (NCB-Hbd). Para isso as condições de hidrólise foram otimizadas para isolar NCBs que diferissem somente em relação às modificações na superfície, a serem avaliadas nas diferenças de potencial zeta ($[\zeta]$). Os outros atributos, como dimensões (diâmetro hidrodinâmico aparente, comprimento, largura e altura) e a cristalinidade, foram uniformizados entre os cristais.

Observou-se que os NCB-HCl obtiveram uma menor estabilidade de dispersão em relação aos outros NCBs, pela precipitação dos cristais. Para ser possível avaliar o tamanho dos NCB-HCl isoladamente através de DLS, foi necessário antes das análises, submetê-los à sonicação (5 min) para desfazer os agregados gerados. Entretanto, aproximadamente 15 min após a sonicação, foi verificada a formação de reaglomeração entre eles. Isso foi observado através do acompanhamento do tamanho em função do tempo, em que os NCB-HCl obtiveram aumentos no diâmetro hidrodinâmico aparente, crescentes após 15 min. Já o tamanho dos NCB-H₂SO₄ e NCB-Hbd se mantiveram estáveis durante todo o

procedimento (FIGURA 12-A). O problema de estabilidade dos NCB-HCl descrito na literatura é justificado pela ausência de cargas em sua superfície. Alguns autores sugeriram que os cristais necessitam de pelo menos 25 mV de p ζ para formarem uma dispersão estável (LU; HSIEH, 2010; WINTER *et al.*, 2010). Isso foi confirmado através de análises de p ζ dos NCBs (FIGURA 12-B), onde os NCB-HCl apresentaram valores próximos a zero, os NCB-H₂SO₄ e NCB-Hbd com valores superiores a 25 mV e $>\pm 10$ mV, respectivamente. O valor de p ζ obtido, pode ser utilizado de forma comparativa, para estimar o grau de sulfatação na superfície dos NCB. Na qual o menor valor p ζ de NCB-Hbd do que NCB-H₂SO₄, é atribuído ao menor grau de sulfatação, devido a menor quantidade utilizada de H₂SO₄ nessa hidrólise.

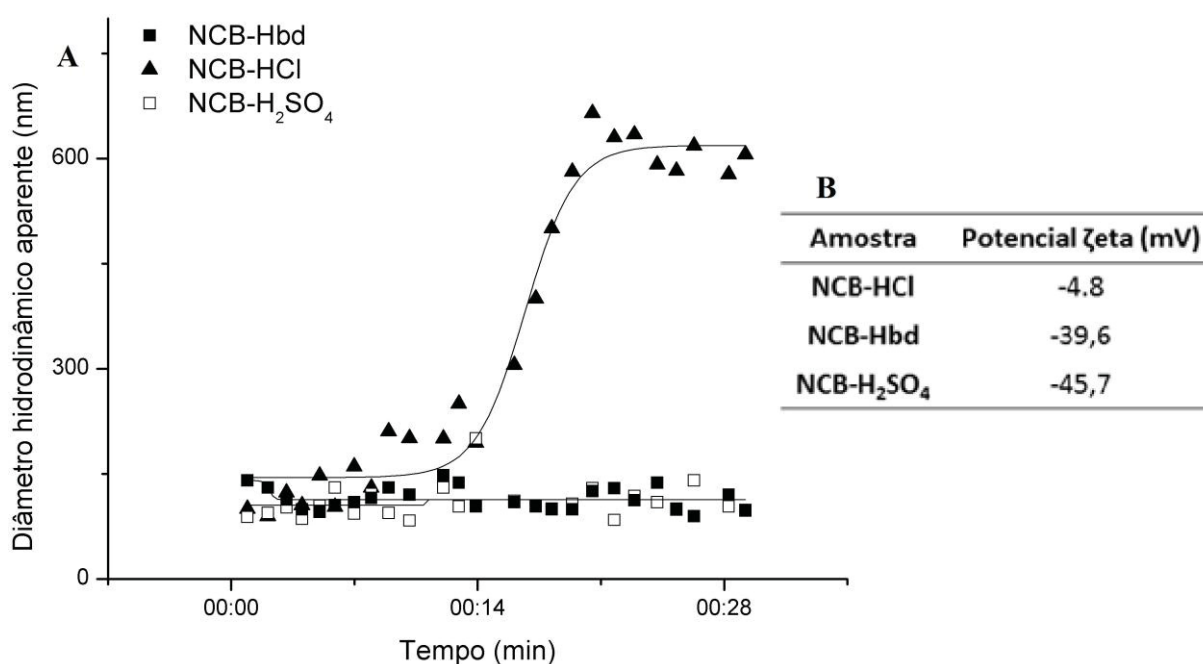


FIGURA 12 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA (p ζ) DOS NANOCRISTAIS (NCBS) ISOLADOS (A) NCBs isolados pelas hidrólises com HCl (NCB-HCl), H₂SO₄ (NCB- H₂SO₄) e Hbd (NCB-Hbd), quanto a tamanho em função do tempo por DLS e potencial zeta (B). Condições: pH 5,5, a 25°C

Os NCB (HCl, H₂SO₄ e Hbd) não diferiram significativamente em relação ao tamanho, apresentando diâmetro hidrodinâmico aparente (FIGURA 13), comprimento, largura, altura e morfologia (FIGURA 14 e TABELA 01) semelhantes.

Tais dimensões são semelhantes às geradas nos NCBs sintetizados por Kalashnikova *et al.* (2011).

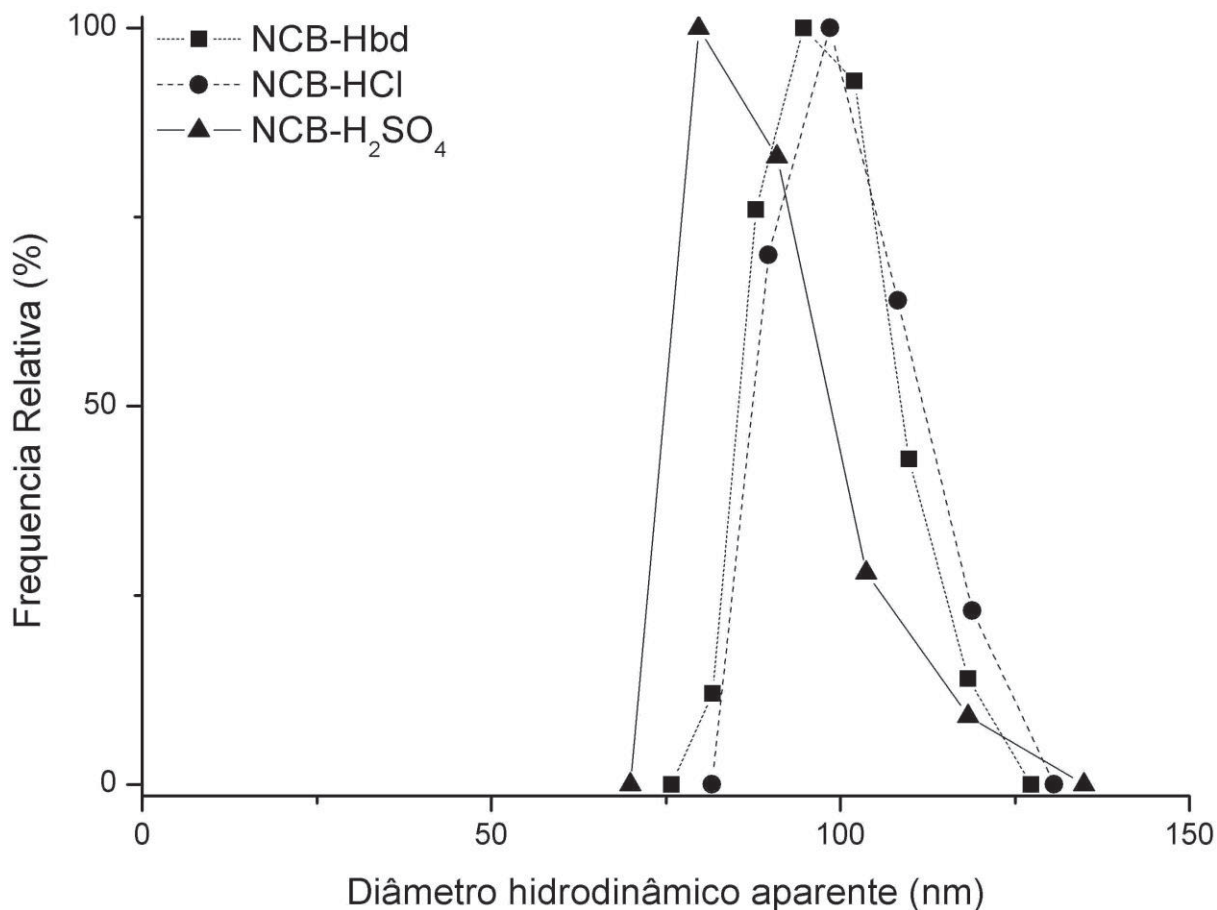


FIGURA 13 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCBS) AVALIADOS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO
NCBs isolados pelas hidrólises com HCl (NCB-HCl), H₂SO₄(NCB-H₂SO₄) e Hbd (NCB-Hbd). Condições: pH 5,5, 25°C

A hidrólise Hbd é, geralmente, utilizada para produzir cristais com morfologia em esferas, entretanto neste trabalho, conforme imagens por MFA, foram produzidos em forma de agulhas, semelhante aos NCB-HCl e NCB-H₂SO₄ (FIGURA 14). Isso, provavelmente, ocorreu devido a ausência da utilização do ultrassom durante a hidrólise, procedimento ao qual alguns autores consideraram necessário para obtenção de NC em forma de esferas (WANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007).

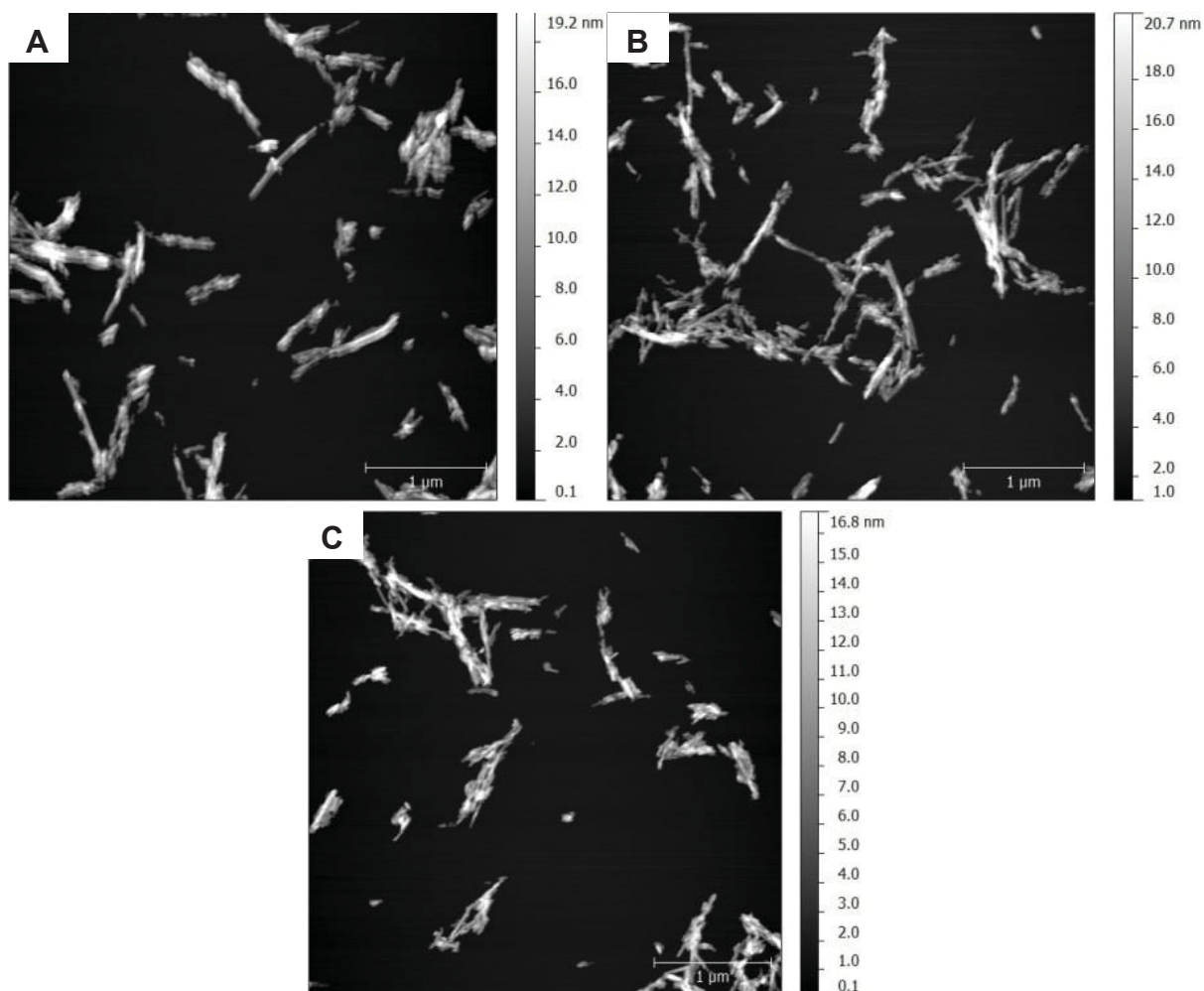


FIGURA 14 – IMAGENS TOPOGRÁFICAS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) ISOLADOS (A) HCl (NCB-HCl), (B) H_2SO_4 (NCB- H_2SO_4) e (C) Hbd (NCB-Hbd). Condições: pH 5,5, 25°C

TABELA 01 – COMPARAÇÃO ENTRE OS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) ISOLADOS QUANTO AO RENDIMENTO E DIMENSÕES DE ACORDO COM OS PROCESSOS DAS HIDRÓLISES

Amostra	^a Rendimento (%, m/m)	^b Comprimento (nm)	^b Largura (nm)	^b Altura (nm)
NCB-HCl	49	100-800	60,43 ± 12.84	8,98 ± 4.37
NCB- H_2SO_4	50	100-800	50,32 ± 15.74	9,21 ± 2.69
NCB-Hbd	46	100-800	55,73 ± 14.49	8,91 ± 3.21

* Hidrólises da CB com HCl (NCB-HCl), H_2SO_4 (NCB- H_2SO_4) ou Hbd (NCB-Hbd)

^a: Razão da quantidade de massa seca do NCB após hidrólise pela quantidade da massa seca da CBp utilizada antes da hidrólise

^b: Dimensões dos NCBs mensuradas das imagens topográficas de MFA

Em relação às análises de DRX, os picos visíveis foram atribuídos para os planos cristalinos de ($1\bar{1}0$), ($1\ 1\ 0$), ($1\ 0\ 2$), ($2\ 0\ 0$) e ($0\ 0\ 4$) correspondentes aos picos de $14,6^\circ$, $16,7^\circ$, $20,5^\circ$, $22,6^\circ$ e $34,2^\circ$, respectivamente, e em $18,5^\circ$ ao halo amorfo (WANG *et al.*, 2007). O pico em $37,7^\circ$, corresponde ao pico da placa de alumínio, não foi utilizado para a realização dos cálculos.

As hidrólises não mostraram alterações em relação ao tipo de cristalinidade da celulose nativa (tipo I) observado pelo perfil dos difractogramas nos NCBs (FIGURA 15), e pela não alteração entre os espaçamento entre os cristais (d) observado na TABELA 02 de antes e após o procedimento da hidrólise. Todos os NCBs obtiveram um aumento da cristalinidade semelhante (+10%) em relação a CBp não hidrolisada, e esses resultados são semelhantes aos NCB obtidos por Wang *et al.* (2007) e por Guo e Catchmark (2012). Não se observou variação sistemática nas dimensões dos cristalitos dos NCBs após a hidrólise, demonstrando juntamente com os resultados de índice de cristalinidade que, aparentemente, a hidrólise foi seletiva às zonas amorfas da celulose, preservando as regiões cristalinas.

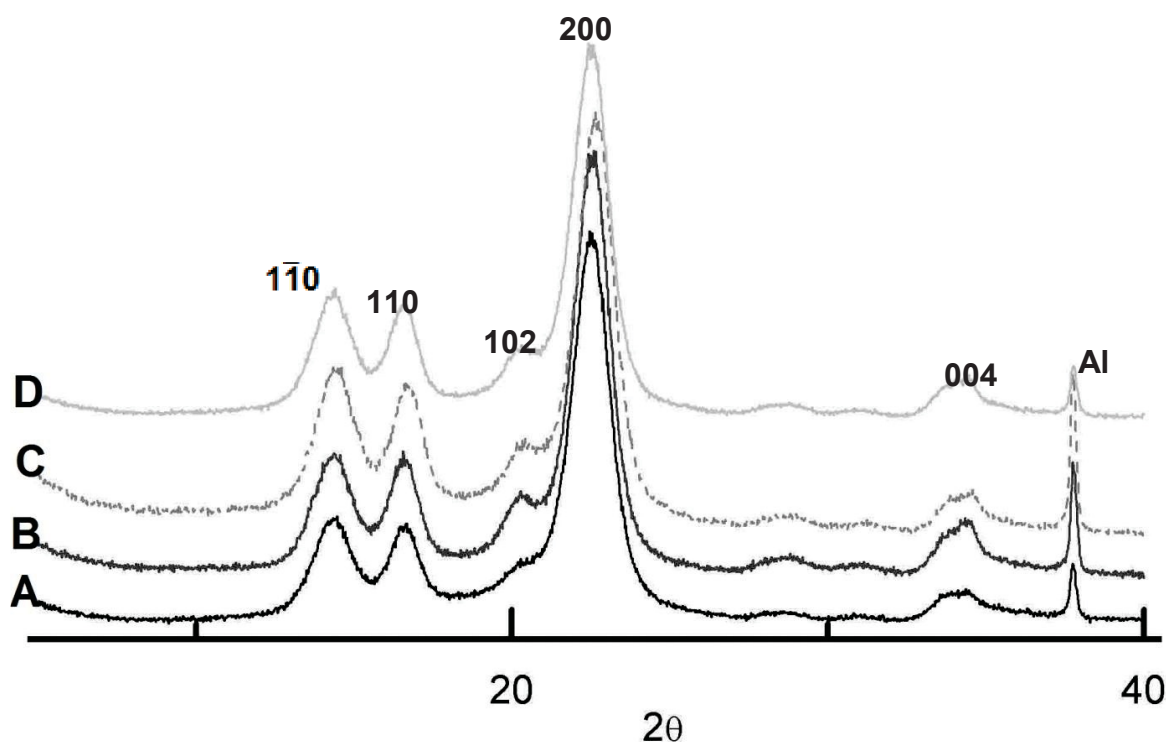


FIGURA 15 – DIFRACTOGRAMAS DA CELULOSE BACTERIANA PROCESSADA (CBp) E DOS SEUS NANOCRISTAIS (NCB) ISOLADOS
Ilustração dos planos cristalinos da CBp (A) e dos NCBs isolados pelas hidrólises com (B) HCl (NCB-HCl), (C) H_2SO_4 (NCB- H_2SO_4) e (D) Hbd (NCB-Hbd)

TABELA 02 – AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS DIFRACTOGRAMAS OBTIDOS DA CELULOSE BACTERIANA PROCESSADA (CBp) E DOS SEUS NANOCRISTAIS (NCB) ISOLADOS

Amostra	^aIC (%)	^b<u>110</u>	<u>110</u>	<u>200</u>
		DAC / d (nm)	DAC / d (nm)	DAC / d (nm)
CBp	72,3	5,63 / 0,60	7,49 / 0,53	5,83 / 0,39
NCB-HCl	83,2	5,41 / 0,60	7,21 / 0,53	5,42 / 0,39
NCB-H₂SO₄	81,8	5,88 / 0,60	7,33 / 0,53	5,22 / 0,39
NCB-Hbd	82,4	6,01 / 0,60	7,94 / 0,53	5,32 / 0,39

^a: Índice de cristalinidade

Avaliação do tamanho (DAC) e espaçamento dos cristalitos (d)

^b: Planos cristalinos

NCBs isolados por hidrólise utilizando: HCl (NCB-HCl), H₂SO₄ (NCB-H₂SO₄) e Hbd (NCB-Hbd)

4.2.4 Escolha do processo para obter os nanocristais de celulose bacteriana para os testes de adsorção com a xiloglucana

Com a homogeneização dos atributos de tamanho, morfologia e cristalinidades realizadas entre os NCB-HCl, NCB-H₂SO₄ e NCB-Hbd essas amostras foram submetidas a testes de adsorção com a XG para avaliar a influência ou não da sulfatação na interação NCB-XG.

Alguns autores sugeriram em modelo de adsorção de XG a NC vegetal, através do método colorimétrico utilizando I₂/KI, que a interação entre a XG e os cristais acontece muito rapidamente e 15 min de incubação já seriam suficientes para avaliá-la (LIMA; BUCKERIDGE, 2001; LIMA *et al.*, 2004). Observou-se que essa informação procede também para os diferentes NCBs isolados de celulose bacteriana produzidos neste trabalho. Sendo evidenciada ao realizar incubações dos NCB-HCl, NCB-H₂SO₄ e NCB-Hbd com a XG, de 15 a 90 minutos; e na qual não foram observadas diferenças significativas de adsorção em relação ao tempo, pela técnica de colorimetria utilizando o I₂/KI (FIGURA 16).

Foram então feitas análises com tempo de incubação de 30 min para todos os NCB, mantendo fixa a massa de NCB e variando a massa de XG, conforme metodologia apresentada (vide item 3.4.2). Não foram detectadas quantidades de XG significativas no sobrenadante pela técnica de I₂/KI, em concentrações de XG

abaixo de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em todos os NCB utilizados. Dessa forma, para realizar o perfil de adsorção, optou-se por utilizar concentrações de XG de $200\text{-}500 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

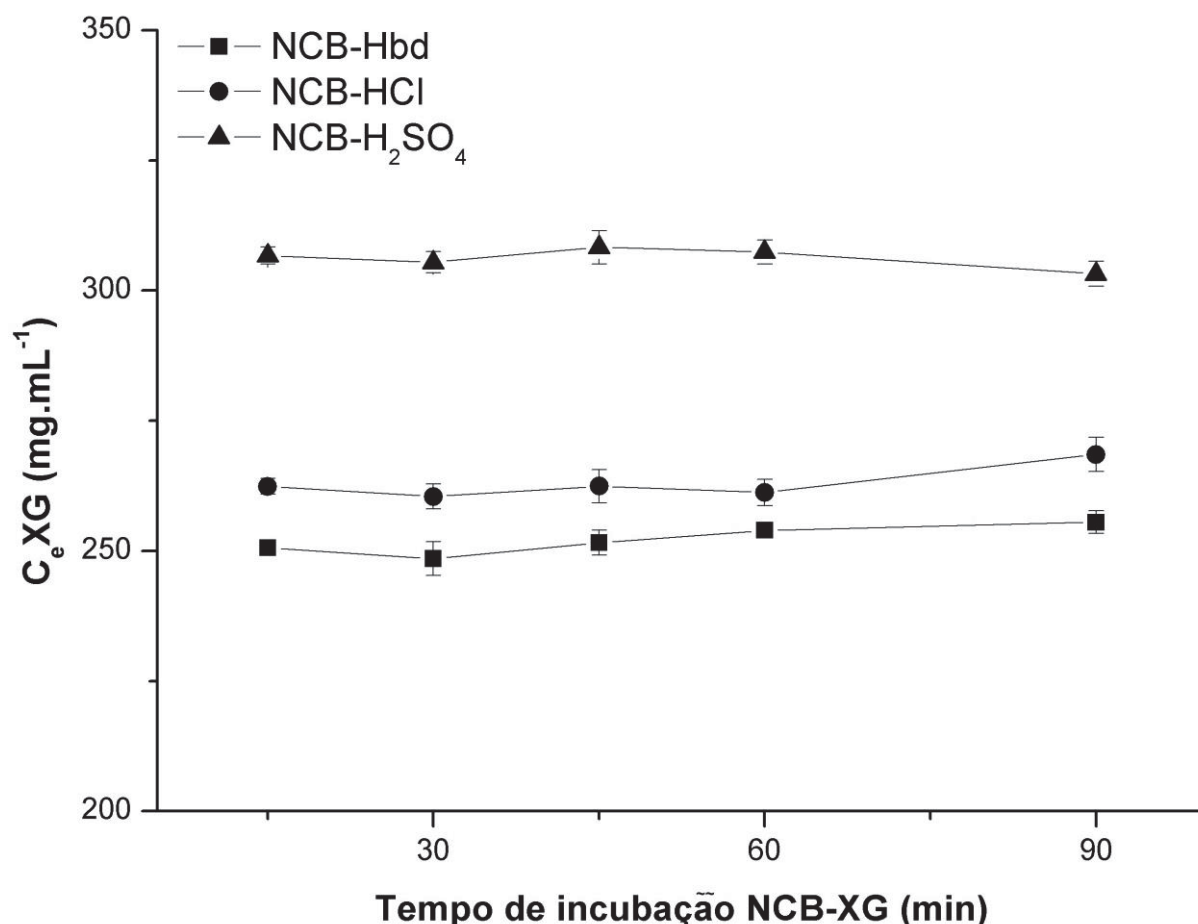


FIGURA 16 – ISOTERMA AVALIANDO A ADSORÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCBS) ISOLADOS
XG ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e NCB isolados (1 mg.mL^{-1}) por hidrólise com HCl (NCB-HCl), H_2SO_4 (NCB- H_2SO_4) e Hbd (NCB-Hbd). C_e : vide equação 1 (item 3.4.2)
Condições: tempo de incubação de 15 a 90 min, pH 5,5, 25°C

Com esse procedimento foi observado um perfil de hiperbole para as isotermas de adsorção de XG aos NCB-HCl e NCB-Hbd demonstrando uma maior adsorção aparente para os NCB-Hbd (FIGURA 17). O NCB- H_2SO_4 não seguiu o perfil de Langmuir, indicando que outra isoterma para esse NCB seria mais adequada. Entretanto, como forma comparativa, esses dados foram linearizados para confirmar se a isoterma segue o perfil de adsorção de Langmuir, e para

quantificar os valores de adsorção máxima (Q_{\max}) e das constante de adsorção/desorção (K). (FIGURA 18).

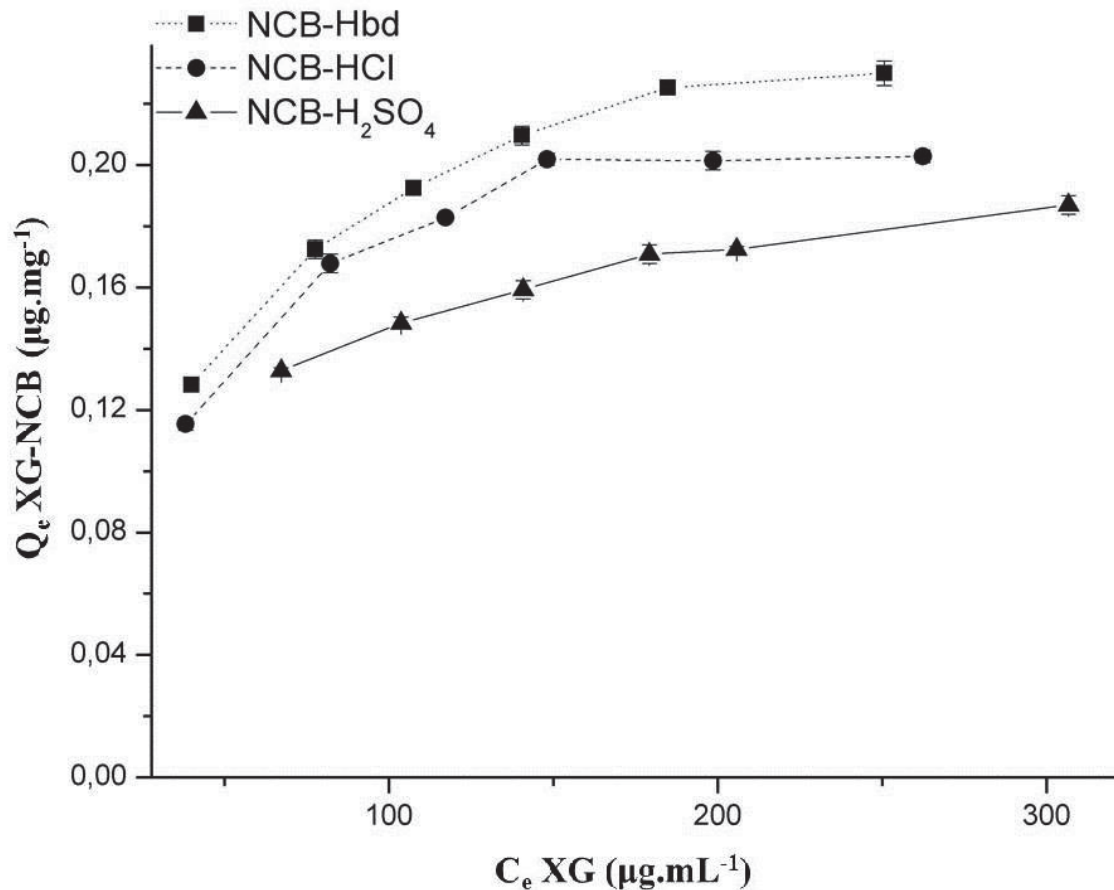


FIGURA 17 – ISOTERMA DA ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) ISOLADOS, EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE XG (200-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e NCB isolados (1 mg.mL^{-1}) por hidrólise com HCl (NCB-HCl), H₂SO₄ (NCB- H₂SO₄) e Hbd (NCB-Hbd). C_e e Q_e vide equação 1 (item 3.4.2) Condições: tempo de incubação de 15 a 90 min, pH 5,5, 25°C

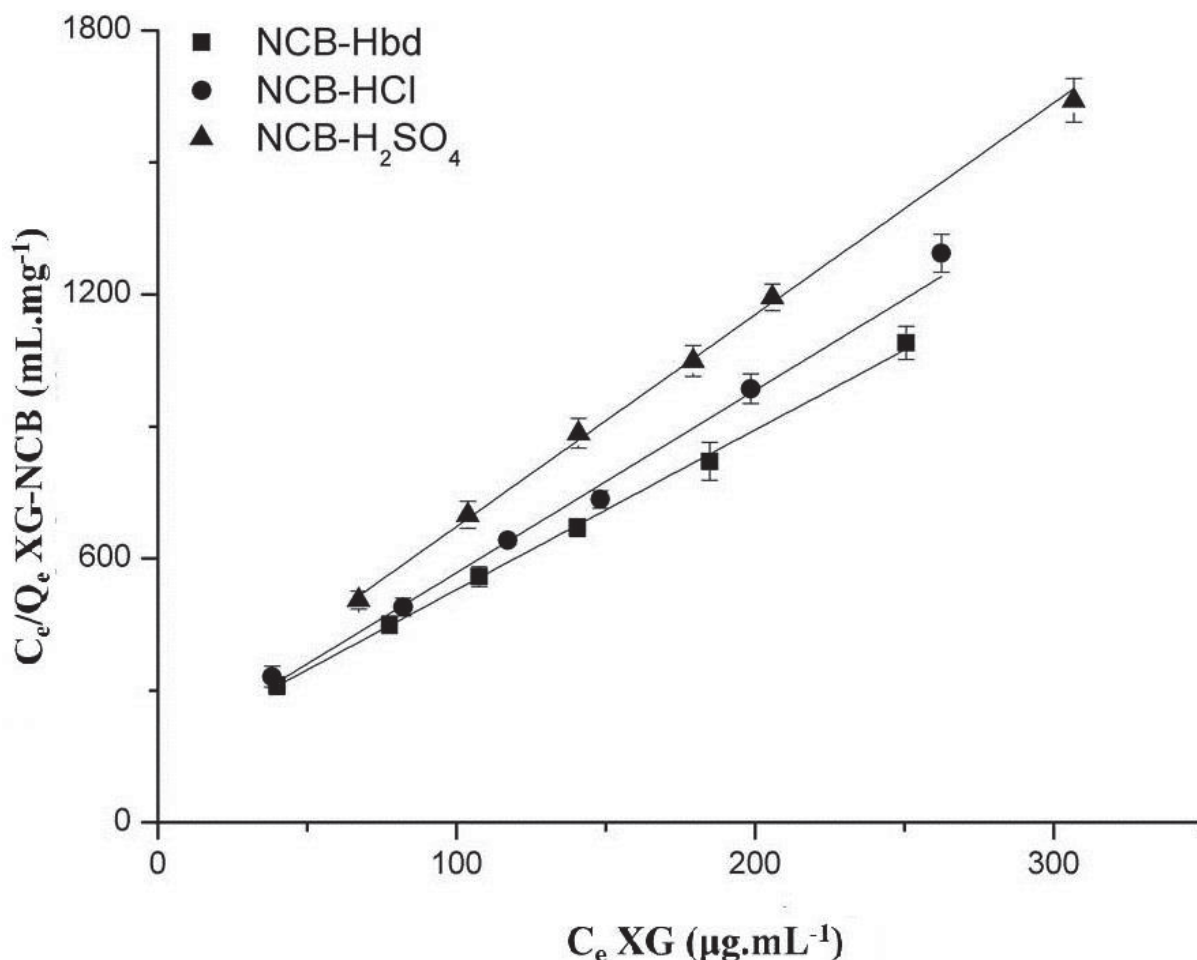


FIGURA 18 – LINEARIZAÇÃO DE LANGMUIR DOS DADOS OBTIDOS DA ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCBS) ISOLADOS, EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE XILOGLUCANA (XG) XG (200-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e NCB isolados (1 mg.mL^{-1}) por hidrólise com HCl (NCB-HCl), H_2SO_4 (NCB- H_2SO_4) e Hbd (NCB-Hbd). C_e e C_e/Q_e vide equação 2 (item 3.4.2)
Condições: tempo de incubação de 15 a 90 min, pH 5,5, 25°C

Como é possível observar pela TABELA 03, os resultados de adsorção de XG-NCB parecem indicar que o grau de sulfatação dos NCB (FIGURA 12-B) apresentaram efeitos tanto negativos (quando em maior percentagem), como também positivo (quando em menor percentagem), em relação a interação entre XG e NCB. Os NCB- H_2SO_4 foram os que apresentaram os maiores graus de sulfatação na superfície e, também, os menores valores de adsorção, indicando comparativamente ao NCB-HCl um efeito negativo na adsorção. Entretanto, os NCB-Hbd também apresentaram sulfatação em sua superfície, mas com uma adsorção significativamente maior do que NCB-HCl, embora que, juntamente ao NCB- H_2SO_4 , apresentaram menores valores de energia de adsorção. Esses

resultados, e as análises de estabilidade (FIGURA 12-A, página 48) e potencial zeta dos NCBs (FIGURA 12-B), sugeriram que uma menor sulfatação ainda, dada pelos grupamentos sulfatos aos NCBs, aumentaram a adsorção de XG-NCB devido ao aumento de sua área superficial de contato com a XG.

TABELA 03 – QUANTIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS OBTIDOS PELAS ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) AOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCBS) ISOLADOS

Amostra	Q _{max} - XG-NCB (µg.mg ⁻¹)	K - XG (mL. µg ⁻¹)
NCB-HCl	235 ± 5,79	(3,01 ± 0,02) x 10 ⁻²
NCB-H ₂ SO ₄	211 ± 2,49	(2,29 ± 0,02) x 10 ⁻²
NCB-Hbd	275 ± 6,23	(2,24 ± 0,03) x 10 ⁻²

Q_{max}: capacidade teórica de adsorção máxima da XG em NCB, vide equação 2 (item 3.4.2)

K: energia de adsorção da XG em NCB, vide equação 2 (item 3.4.2)

NCBs isolados por hidrólise utilizando: HCl (NCB-HCl), H₂SO₄ (NCB-H₂SO₄) e Hbd (NCB-Hbd)

Com base nesses resultados foi possível determinar que o NCB-Hbd teve a melhor adsorção sobre a XG, sendo também mais efetivo na adsorção (275 µg.mg⁻¹ – XG.NCB⁻¹) em solução do que outros utilizados em literatura, que são isolados utilizando somente HCl ou H₂SO₄ (JEAN *et al.*, 2008; CERCLIER *et al.*, 2010; LOPEZ *et al.*, 2010). Isto se deve as características como maior estabilidade do que cristais que não apresentam modificação na superfície, atribuindo uma maior área superficial disponível para adsorção; e por possuir menor modificações em sua superfície. Por esse motivo ele foi o escolhido para a síntese de nanopartículas de NCB adsorvidas com XG (NCB-XG), e foi nomeado a partir desse tópico apenas como NCB.

4.3 Adsorção da xiloglucana com nanocristais de celulose bacteriana

O NCB escolhido apresentou valores de pζ negativo consideravelmente alto (FIGURA 12-B – página 48), já a XG mostrou valores próximos à zero (-3,26 mV). Aproveitando essas diferenças entre esses biopolímeros, a adsorção foi acompanhada também através de mudanças no pζ dos NCB adsorvidos com a XG

(FIGURA 19). Levando em consideração que o modelo de adsorção NCB-XG segue o modelo de adsorção de Langmuir, a XG, teoricamente, recobriria constantemente e totalmente a superfície do NCB.

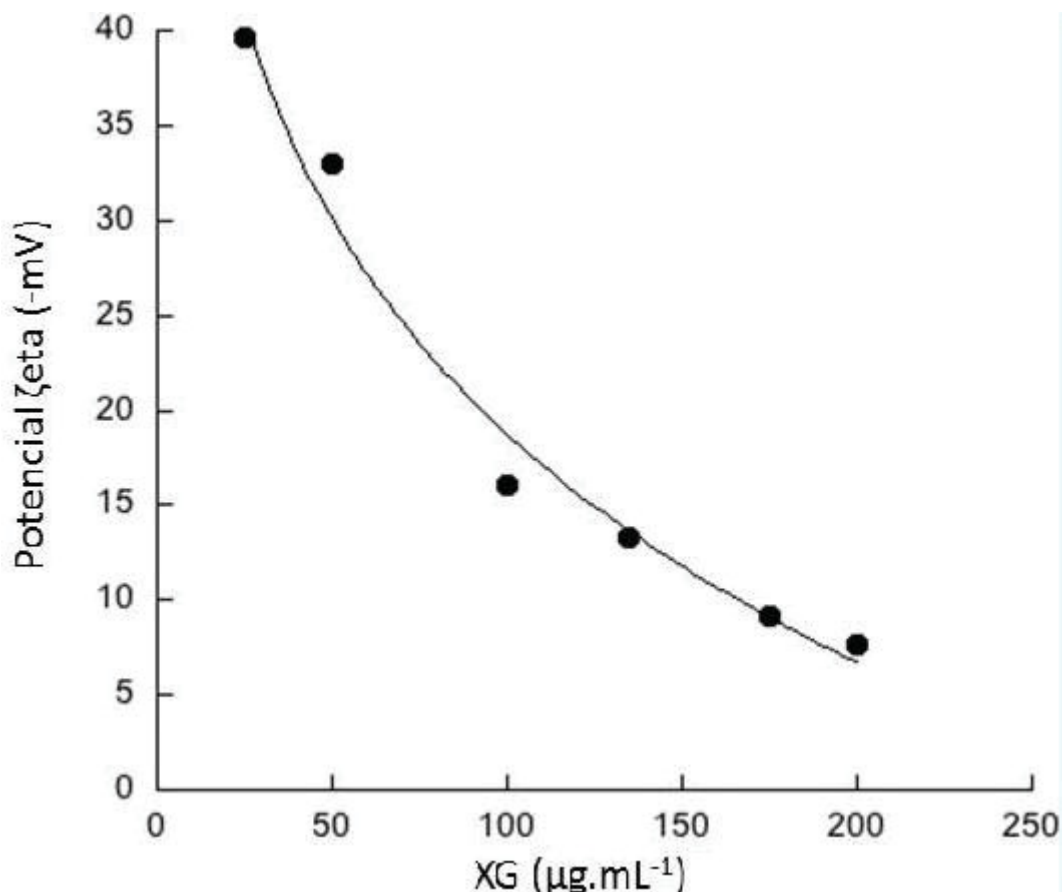


FIGURA 19 – REVESTIMENTO DA SUPERFÍCIE DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) POR XILOGLUCANA (XG) ACOMPANHADO POR MUDANÇAS NO POTENCIAL ZETA ($p\zeta$)
Condições: XG (25-200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e NCB (1 mg.mL^{-1}). pH 5,5, a 25°C

Foi observado pelo decaimento do $p\zeta$ o recobrimento constante da superfície dos NCBs por XG, conforme foi aumentando a concentração de XG. O decaimento de $p\zeta$ atingiu um patamar em concentrações de XG próximas a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a dependência do decaimento do $p\zeta$ em função da concentração de XG (equação 3 - item 3.4.3) foi baixa (0,116), mostrando um revestimento progressivo da superfície do NCB e da influência negativa da sulfatação da superfície na interação com a XG, corroborando com os resultados observados anteriormente pela isoterma de Langmuir (FIGURA 17 – página 54). O valor alto de $p\zeta$ observado nos NCB se deve

aos grupos sulfatos na superfície. Dessa forma, se a XG tivesse maior ou igual afinidade por essa superfície sulfatada, do que as regiões sem sulfatação (nativa), seria observado um maior valor dessa dependência, caracterizado por um perfil linear, apresentando um decaimento rápido em menores concentração de XG. Com esses resultados, foi possível determinar uma razão ótima de massa de $\pm 190 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ ($\text{XG}.\text{NCB}^{-1}$) para a adsorção em solução.

Assim, utilizando essas condições de otimização da relação de massa XG:NCB, foi verificada alterações nas dimensões e estabilidade dos NCB revestidos por XG através de análises de DLS. A FIGURA 20 ilustra esse ensaio, sendo demonstrados aumentos nos diâmetros hidrodinâmico aparente da XG e NCB livres e dos NCB revestidos com XG (NCB-XG).

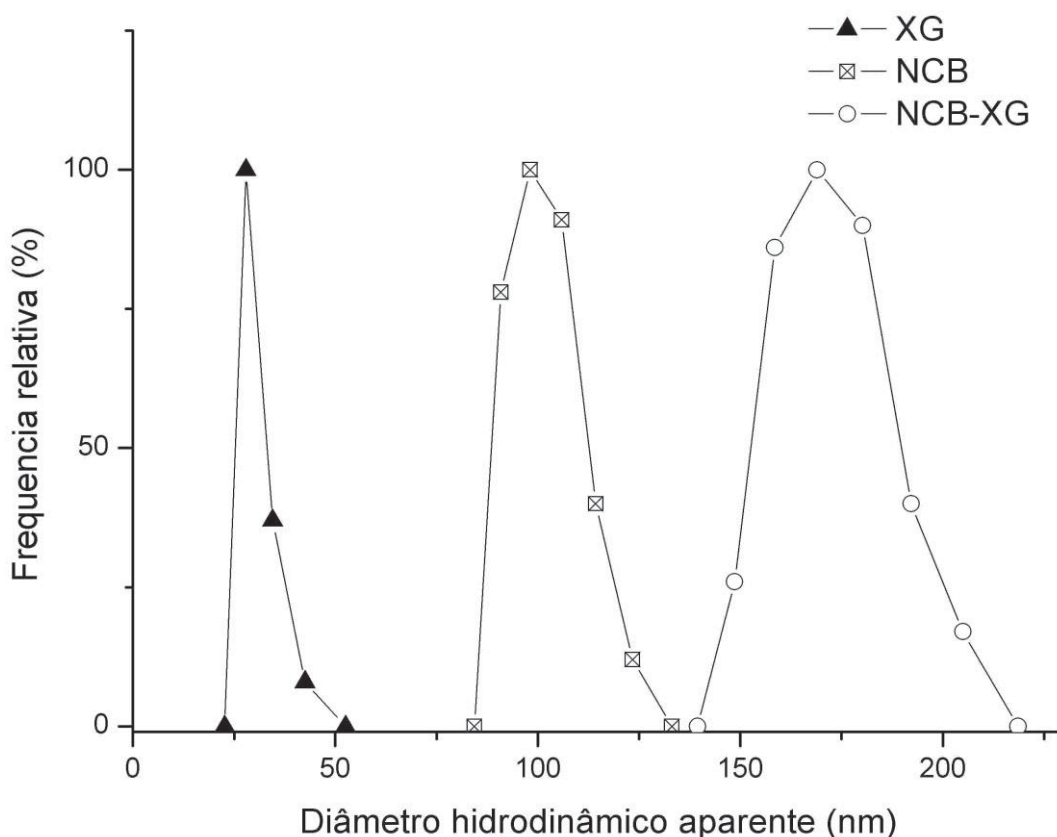


FIGURA 20 – COMPARAÇÃO DOS DIÂMETROS HIDRODINÂMICO APARENTE AVALIADOS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO DA XILOGLUCANA (XG) E NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) ISOLADOS, E APÓS ADSORVIDOS (NCB-XG)

Adsorção realizada com proporção de massa de $190 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ ($\text{XG}.\text{NCB}^{-1}$)

Condições: pH 5,5, a 25°C

Soluções de NCB-XG nas condições de $190 \mu\text{g.mg}^{-1}(\text{XG-NCB}^{-1})$ obtiveram estabilidade em solução, não sendo observada a formação de agregados, caracterizados pela distribuição de tamanho por DLS, e que foi repetida mesmo 5 dias após a incubação. Como foi visto pelos ensaios de adsorção através do $p\zeta$, nessas condições de concentração, os NCB-XG apresentam valores de $p\zeta$ inferiores a -10 mV e, por teoria, não apresentariam boa estabilidade. A estabilidade das NCB-XG, provavelmente, se deve as propriedades hidrossolúveis da XG, causando um impedimento estérico quanto à interação interpartículas, impedindo a aproximação das mesmas e, conseqüentemente, garantindo a sua estabilidade. Esses resultados foram similares aos realizados por Winter *et al.* (2010), que detectaram maior estabilidade dos NCB revestidos por XG em solução, e afirmaram que, provavelmente, pela maior solubilidade da XG, a estabilidade foi aprimorada por esse revestimento.

Nessas condições de razão de massa XG:NCB otimizadas, foram verificadas alterações na morfologia, largura e altura dos nanocompósitos (FIGURA 21). O NCB-XG teve um aumento no tamanho em relação à NCB (TABELA 04), exibindo aumento estatisticamente significativo ($p > 0,0001$) na largura e altura de 16,85 nm e 3,44 nm, respectivamente. Porém, as medidas de largura isolada não foram confiáveis, devido a uma ampliação causada pela convolução da ponta utilizada na MFA. Entretanto, quando avaliados de forma comparativa, foi confirmado que há um aumento efetivo na largura dos NCB-XG. O aumento da altura não é afetado pela ampliação gerada pela ponta, podendo ser utilizado como parâmetro para determinar a espessura do revestimento do NCB. Os valores dos aumentos das dimensões pelo revestimento foram semelhantes aos observados por Jean *et al.* (2008), e por Cerclier *et al.* (2010) ao adsorverem NC vegetal a XG.

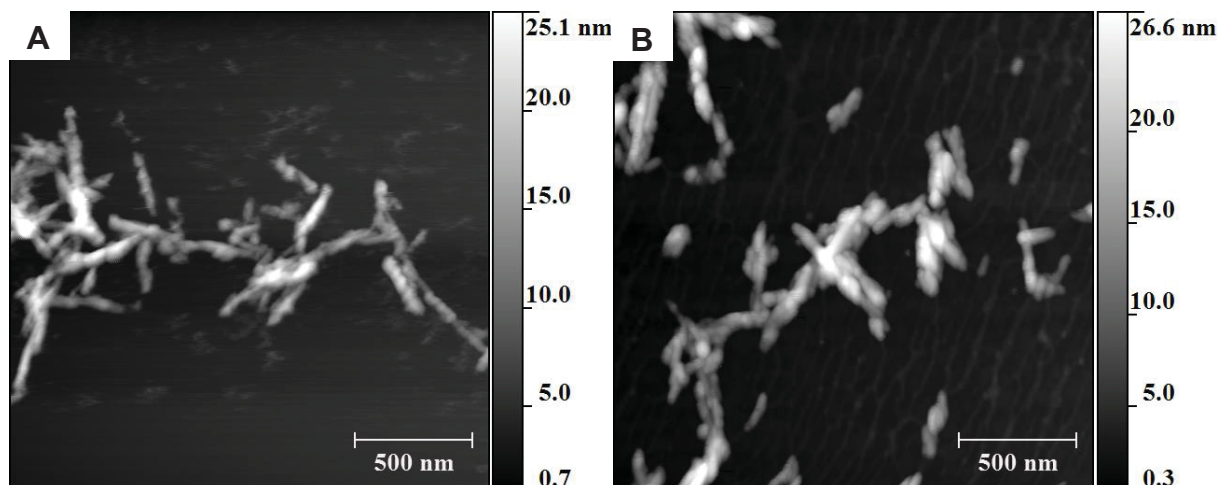


FIGURA 21 – MORFOLOGIAS POR TOPOGRAFIAS DE IMAGEM DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) E DA ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) A NCB NCB (A) e NCB revestidos por XG (B)
Condições: pH 5,5, a 25°C

TABELA 04 – MÉDIAS DAS DIMENSÕES, DA ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) SOBRE OS NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB), AVALIADAS POR TOPOGRAFIAS DE IMAGEM DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

Amostra	Largura (nm)	Altura (nm)
NCB	55,73 ± 14,49	***8,91 ± 3,21
NCB-XG	72,58 ± 9,72	***12,35 ± 2,95

****p>0,0001****

Para verificar a possibilidade de sintetizar nanopartículas construídas por múltiplas camadas sucessivas de NCB e XG (M_cNCB-XG), foram realizadas adsorções pela técnica de automontagem (*Layer by Layer – LbL*). A deposição das camadas foi acompanhada em relação à deposição de massa, através de perturbações na frequência do cristal de quartzo em microbalança de cristal de quartzo (MCQ); da espessura por elipsometria; da homogeneidade e morfologia por imagens topográficas das camadas realizadas por MFA.

A primeira camada de PEI, utilizada para ancorar a deposição das demais, parece ter exercido grande influência na primeira deposição da camada de NCB, como é possível observar pelos resultados de MCQ (FIGURA 22) e de elipsometria (FIGURA 23), que mostraram altos valores de deposição de massa e espessura, respectivamente. A alta deposição de NCB somente na primeira camada se deve as

propriedades fortemente adesivas do PEI, e por ser um polieletrólito catiônico apresentou alta adsorção por NCB que é aniônico.

Após a primeira deposição, como é observado tanto por resultados de MCQ, quanto de elipsometria, a deposição das camadas parece ter atingido uma linearidade de crescimento em relação à massa e a espessura, com resultados similares aos obtidos por Jean *et al.* (2008), e por Cerclier *et al.* (2010) na adsorção de nanocristais de celulose vegetal a XG em sistemas bidimensionais.

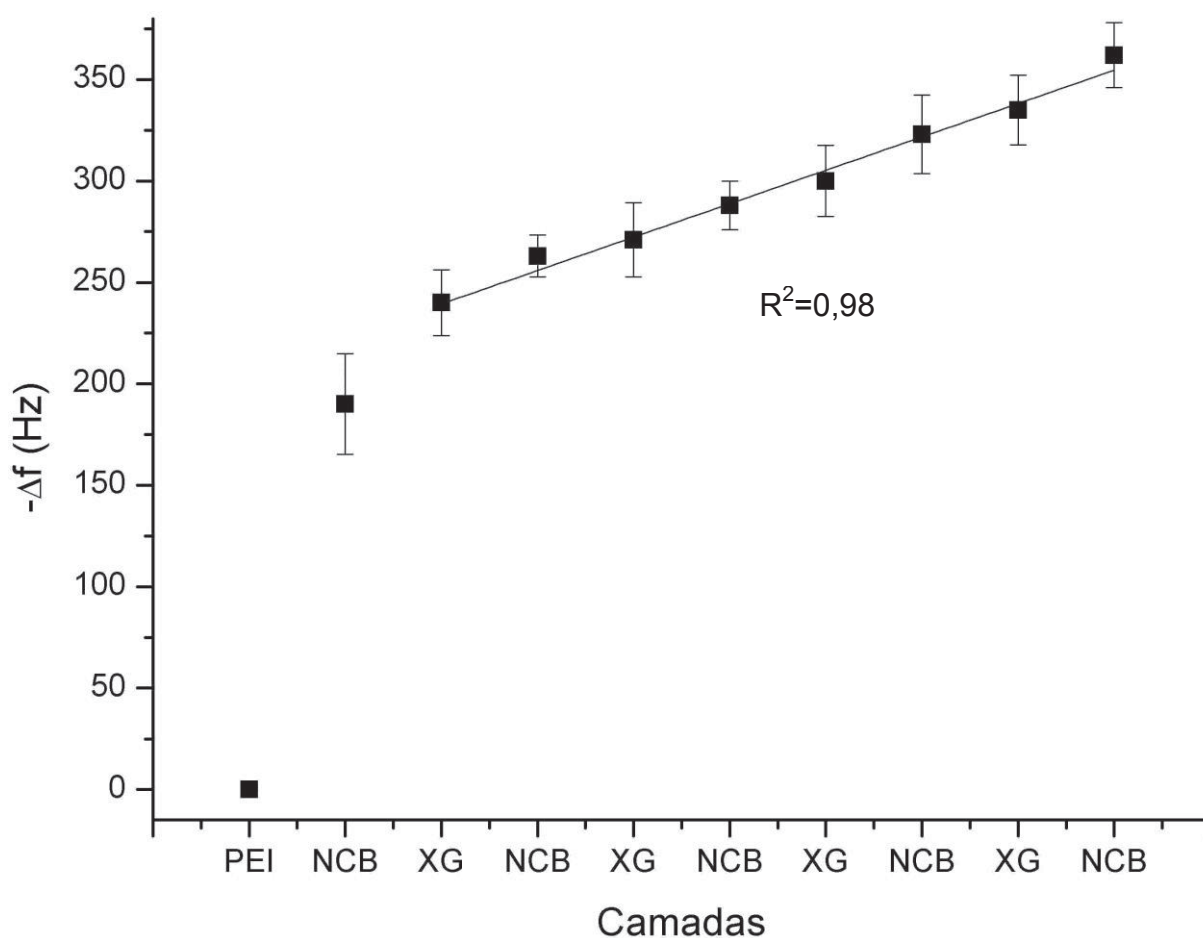


FIGURA 22 – ADSORÇÃO DE XILOGLUCANA (XG) A NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) POR AUTOMONTAGEM (*LbL*) ACOMPANHADA POR MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO (MCQ)
Acompanhamento de ganho e perda de massa do sistema de multicamadas alternadas por NCB (1 mg.mL⁻¹) e XG (1 mg.mL⁻¹) (M_cNCB-XG), através de perturbações na frequência (Δf – Hz) do cristal de quartzo revestido por uma camada de polietilenimina (PEI) (1 mg.mL⁻¹)
Condições: pH 5,5, a 25° C

Os valores de espessura avaliados por elipsometria (FIGURA 23) estão de acordo com as medidas de altura dos NCB-XG obtidos pelas análises de MFA anteriormente (TABELA 04 – página 60), e com os resultados obtidos por MCQ. Dessa forma, é possível prever o revestimento de partículas por M_cNCB-XG, o qual pode ser caracterizado por uma espessa camada de NCB e uma fina camada de XG

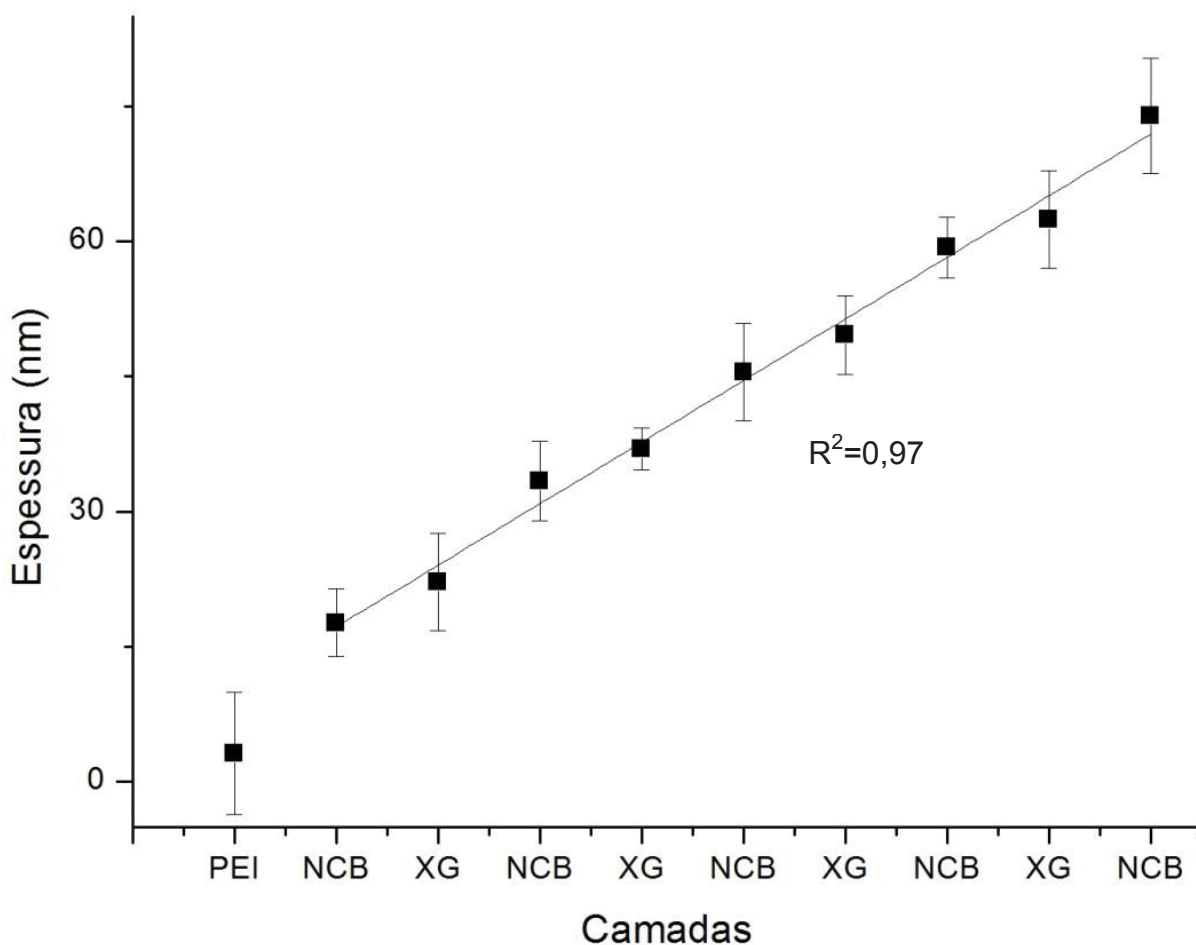


FIGURA 23 – ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) A NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) POR AUTOMONTAGEM (*LbL*), ACOMPANHADA POR ELIPSOMETRIA

Acompanhamento do crescimento da espessura do sistema de multicamadas alternadas por NCB (1 mg.mL⁻¹) e XG (1 mg.mL⁻¹) (M_cNCB-XG), através de perturbações no índice de difração do placa de dióxido de silício revestida por uma camada de PEI (1 mg.mL⁻¹)

Condições: pH 5,5, a 25° C

A superfície dessas camadas apresentou baixa rugosidade (TABELA 05) e, juntamente, com os resultados obtidos por MCQ e elipsometria, sugere que as camadas são consideravelmente homogêneas. Os valores de rugosidade obtidos

por imagens topográficas de MFA (FIGURA 24) corroboraram com os resultados de MCQ e elipsometria, mostrando uma homogeneidade de superfície em todas as camadas depositadas.

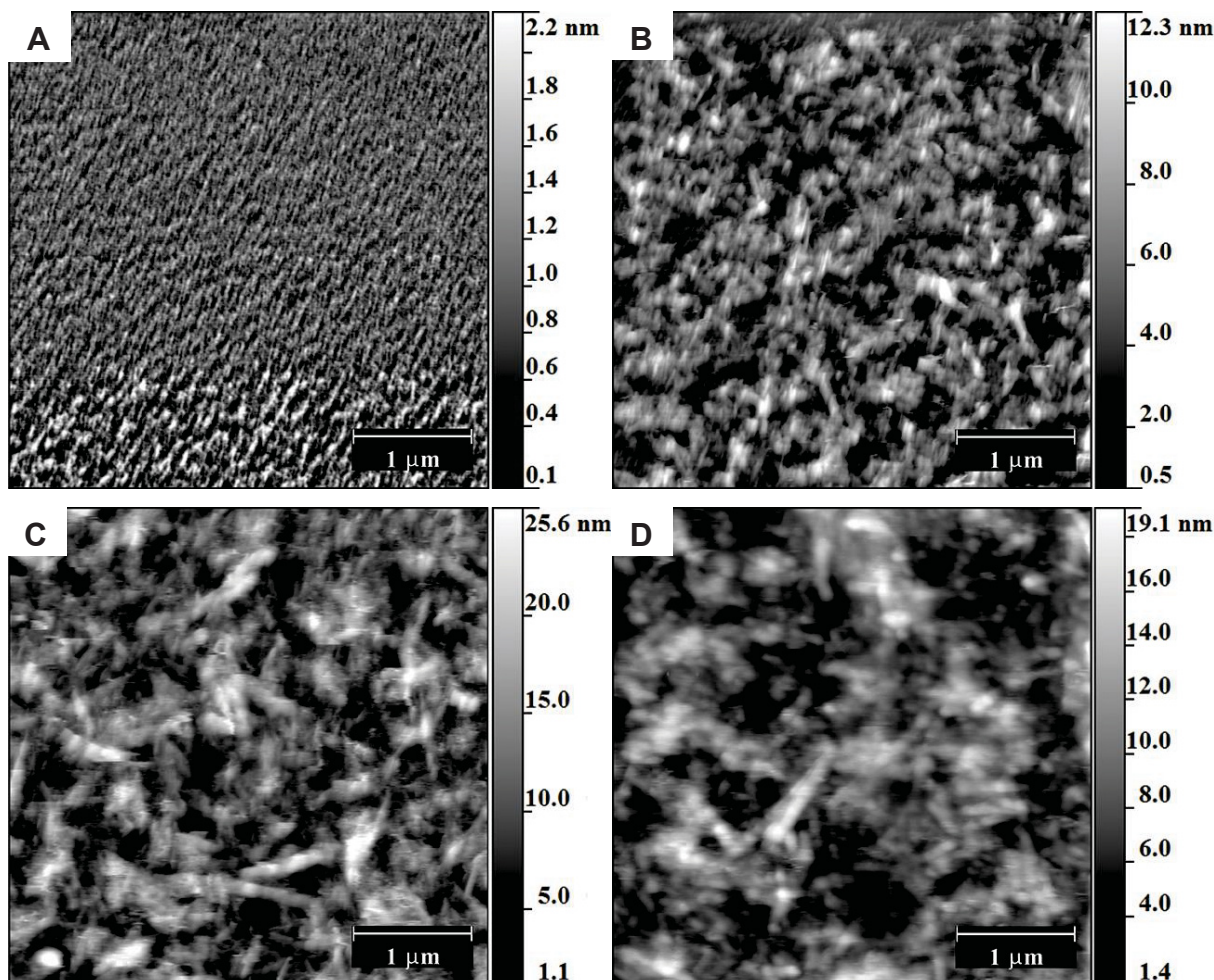


FIGURA 24 – ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) A NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) POR AUTOMONTAGEM (*LbL*) ACOMPANHADA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)
Acompanhamento da rugosidade da superfície das camadas do sistema de multicamadas alternadas por NCB (1 mg.mL^{-1}) e XG (1 mg.mL^{-1}) ($M_c\text{NCB-XG}$), através de varredura por MFA da superfície de uma placa de mica adsorvida por uma camada de PEI (1 mg.mL^{-1})
Camada de PEI (A), PEI+NCB (B), PEI+NCB+XG (C) e PEI+NCB+XG+NCB (D).
Condições: pH 5,5 – 25° C

TABELA 05 – MÉDIA DA ESPESSURA E RUGOSIDADE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) DA ADSORÇÃO DA XILOGLUCANA (XG) A NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (NCB) POR AUTOMONTAGEM (LBL)

Camada	^aEspessura (nm)	^bRugosidade (nm)
PEI	2,91 ± 0,10	0,16 ± 0,03
XG	3,84 ± 2,74	3,71 ± 0,18
NCB	9,86 ± 3,53	3,42 ± 0,31

^a: Valores médios da espessura obtido por elipsometria

^b: Valores médios da rugosidade obtidos por análise das imagens de topografia obtidos por MFA

5 CONCLUSÕES

Dentre as hidrólises efetuadas, somente as realizadas em meio ácido foram eficientes para isolar os nanocristais de celulose bacteriana (NCB-H₂SO₄, NCB-HCl e NCB-Hbd, respectivamente). Em todos os processos para obtenção, o pré-tratamento (moinho e ultrassom) e a hidrólise, foram bem sucedidos.

Na obtenção de NCB-Hbd foi utilizada uma concentração menor de H₂SO₄ do que a relatada na literatura (de 1,83 para 1,28 mol.L⁻¹). Com isso gerou menor grau de sulfatação, porém suficiente para dar estabilidade aos cristais em dispersão. Por tal propriedade foi o escolhido para o desenvolvimento de NCB revestidos com XG (NCB-XG).

Quanto à adsorção de NCB a XG foi demonstrada a interação pura e as condições de síntese das partículas de NCB-XG estáveis em solução, sem a interferência de outras forças nos ensaios, como a centrifuga (*spin coating*), e o efeito de secagem (*solvent-casting*). Também, foi possível a aplicação desse modelo de adsorção para o revestimento tridimensional de partículas utilizando a técnica de automontagem.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a capacidade de um revestimento estável para partículas tridimensionais utilizando multicamadas de NCB e XG, abrindo, por exemplo, as seguintes perspectivas:

- Estudos de síntese envolvendo o uso simultâneo de ultrassom para avaliar a possível formação de nanoesferas de celulose;
- Pré-hidrólise enzimática da CB com celulase, seguida de síntese de NCB utilizando hidrólise híbrida entre HCl e H₂SO₄ (Hbd);
- Adsorção de fármacos instáveis e pouco solúveis em meio biológico, sobre os nanocristais e nanoesferas de celulose, com posterior revestimento com xiloglucana, modulando assim a cinética de liberação promovendo uma cinética de liberação prolongada de fármacos;
- Estudos que objetivem a adsorção de lipossomas unilamelares gigantes (LUG) em filmes de NCB, com posterior revestimento com multicamadas de NCB e XG (LUGNX);
- Utilização do LUGNX para o estudo dos seguintes parâmetros: a) estabilidade do revestimento; b) mudanças nas propriedades mecânicas e físico-químicas geradas; c) estabilidade em solução dos LUG revestidos; d) capacidade e estabilidade de armazenamento em regimes mais concentrados de LUGNX com a finalidade de testar formas de armazenamento;
- Incorporação de fármacos instáveis e/ou em extremos de log de P no LUG, devido à versatilidade do lipossoma como veículo, e realização do revestimento com avaliação dos parâmetros anteriores;
- Avaliação do prolongamento da cinética de liberação dos fármacos, entre outros.

7 REFERÊNCIAS

- ABE, K.; IWAMOTO, S.; YANO, H. Obtaining Cellulose Nanofibers with a Uniform Width of 15 nm from Wood. **Biomacromolecules**. v. 8, n. 10, p. 3276-3278, 2007.
- ARAKI, J.; WADA, M.; KUGA, S.; OKANO, T. Influence of surface charge on viscosity behavior of cellulose microcrystal suspension. **Journal of Wood Science**. v. 45, n. 3, p. 258-261, 1999.
- ATALLA, R. H.; VANDERHART, D. L. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. **Science**. v. 223, n. 4633, p. 283-285, 1984.
- AZZAM, R. M. A.; BASHARA, N. M. **Ellipsometry and polarized light**. North Holland, Amsterdam, 1987.
- BATTISTA, O. A.; COPPICK, S.; HOWSMON, J. A.; MOREHEAD, F. F.; SISSON, W. A. Level-Off Degree of Polymerization. **Industrial & Engineering Chemistry**. v. 48, n. 2, p. 333-335, 1956.
- BECK-CANDANEDO, S.; ROMAN, M.; GRAY, D. G. Effect of Reaction Conditions on the Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions. **Biomacromolecules**. v. 6, n. 2, p. 1048-1054, 2005.
- BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic light scattering**. Krieger, 1976.
- BHATTACHARYA, S.; BAL, S.; MUKHERJEE, R. K.; BHATTACHARYA, S. Rheological behaviour of tamarind (*Tamarindus indica*) kernel powder (TKP) suspension. **Journal of Food Engineering**. v. 13, n. 2, p. 151-158, 1991.
- BONDESON, D.; MATHEW, A.; OKSMAN, K. Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. **Cellulose**. v. 13, n. 2, p. 171-180, 2006.
- BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E. H. **Polymer Handbook**. New York. John Wiley & Sons, 1966.
- BRAUN, B.; DORGAN, J. R. Single-step method for the isolation and surface functionalization of cellulosic nanowhiskers. **Biomacromolecules**. v. 10, n. 2, p. 334-341, 2009.

BUCKERIDGE, M. S.; ROCHA, D. C.; REID, J. S. G.; DIETRICH, S. M. C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. **Physiologia Plantarum**. v. 86, n. 1, p. 145-151, 1992.

BURGALASSI, S.; PANICHI, L.; SAETTONE, M. F.; JACOBSEN, J.; RASSING, M. R. Development and in vitro/in vivo testing of mucoadhesive buccal patches releasing benzydamine and lidocaine. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 133, n. 1-2, p. 1-7, 1996.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**. v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CERCLIER, C.; COUSIN, F.; BIZOT, H.; MOREAU, C. L.; CATHALA, B. Elaboration of Spin-Coated Cellulose-Xyloglucan Multilayered Thin Films. **Langmuir**. v. 26, n. 22, p. 17248-17255, 2010.

CHEN, Y.; STIPANOVIC, A.; WINTER, W.; WILSON, D.; KIM, Y.-J. Effect of digestion by pure cellulases on crystallinity and average chain length for bacterial and microcrystalline celluloses. **Cellulose**. v. 14, n. 4, p. 283-293, 2007.

COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCI, C.; ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**. v. 119, n. 1, p. 5-24, 2007.

ELAZZOUI-HAFRAOUI, S.; NISHIYAMA, Y.; PUTAUX, J.-L.; HEUX, L.; DUBREUIL, F.; ROCHAS, C. The Shape and Size Distribution of Crystalline Nanoparticles Prepared by Acid Hydrolysis of Native Cellulose. **Biomacromolecules**. v. 9, n. 1, p. 57-65, 2007.

ERONEN, P.; ÖSTERBERG, M.; HEIKKINEN, S.; TENKANEN, M.; LAINE, J. Interactions of structurally different hemicelluloses with nanofibrillar cellulose. **Carbohydrate Polymers**. v. 86, n. 3, p. 1281-1290, 2011.

FENGEL, D. W., G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin. Walter de Gruyter, 1989.

FILSON, P. B.; DAWSON-ANDOH, B. E.; SCHWEGLER-BERRY, D. Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp. **Green Chemistry**. v. 11, n. 11, p. 1808-1814, 2009.

FINKENSTADT, V. L.; HENDRIXSON, T. L.; MILLANE, R. P. Models of Xyloglucan Binding to Cellulose Microfibrils¹. **Journal of Carbohydrate Chemistry**. v. 14, n. 4-5, p. 601-611, 1995.

FREITAS, R. A.; BUSATO, A. P.; MITCHELL, D. A.; SILVEIRA, J. L. M. Degalatosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependent static light scattering, HPSEC-MALLS and viscosimetry. **Carbohydrate Polymers**. v. 83, n. 4, p. 1636-1642, 2011.

FREITAS, R. A.; MARTIN, S.; SANTOS, G. L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. **Carbohydrate Polymers**. v. 60, n. 4, p. 507-514, 2005.

FRY, S. C. The Structure and Functions of Xyloglucan. **Journal of Experimental Botany**. v. 40, n. 1, p. 1-11, 1989.

GELIN, K.; BODIN, A.; GATENHOLM, P.; MIHRANYAN, A.; EDWARDS, K.; STRØMME, M. Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy. **Polymer**. v. 48, n. 26, p. 7623-7631, 2007.

GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; BAWA, A. S.; SIDDARAMAIAH. Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 48, n. 1, p. 50-57, 2011.

GEORGE, J.; SIDDARAMAIAH. High performance edible nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**. v. 87, n. 3, p. 2031-2037, 2012.

GUO, J.; CATCHMARK, J. M. Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**. v. 87, n. 2, p. 1026-1037, 2012.

HANTUS, S.; PAULY, M.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P.; YORK, W. S. Structural characterization of novel L-galactose-containing oligosaccharide subunits of jojoba seed xyloglucans. **Carbohydr Res**. v. 304, n. 1, p. 11-20, 1997.

HAYASHI, J.; SUFOKA, A.; OHKITA, J.; WATANABE, S. The confirmation of existences of cellulose IIII, IIIII, IVI, and IVII by the X-ray method. **Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition**. v. 13, n. 1, p. 23-27, 1975.

HAYASHI, N.; KONDO, T.; ISHIHARA, M. Enzymatically produced nano-ordered short elements containing cellulose I beta crystalline domains. **Carbohydrate Polymers**. v. 61, n. 2, p. 191-197, 2005.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the Primary Cell Wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 40, n. 1, p. 139-168, 1989.

HAYASHI, T.; MARSDEN, M. P.; DELMER, D. P. Pea Xyloglucan and Cellulose: VI. Xyloglucan-Cellulose Interactions in Vitro and in Vivo. **Plant Physiol**. v. 83, n. 2, p. 384-389, 1987.

HAYASHI, T.; TAKEDA, T.; OGAWA, K.; MITSUISHI, Y. Effects of the degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose. **Plant Cell Physiol**. v. 35, n. 6, p. 893-899, 1994.

HEINZE, T. B., H.; EBRINGEROVÁ.; HARDING, S. E.; HDROMÁDKOVÁ, Z.; MUZZARELLI, C.; MUZZARELLI, R.A.A; PAULSEN, B.S.; EL SEOUD, O.A. **Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use**. Germany. Springer-verlag Berlin Heidelberg, 2005.

HORRI, F. **Wood and Cellulosic Chemistry**. Basel. Marcel Dekker, 2001.

HSIEH, Y. C.; YANO, H.; NOGI, M.; EICHHORN, S. An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments. **Cellulose**. v. 15, n. 4, p. 507-513, 2008.

IBRAHIM, M. M.; EL-ZAWAWY, W. K.; NASSAR, M. A. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/nanospherical cellulose particle films. **Carbohydrate Polymers**. v. 79, n. 3, p. 694-699, 2010.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**. v. 35, n. 2, p. 261-270, 2000.

ITOH, K.; YAHABA, M.; TAKAHASHI, A.; TSURUYA, R.; MIYAZAKI, S.; DAIRAKU, M.; TOGASHI, M.; MIKAMI, R.; ATTWOOD, D. In situ gelling xyloglucan/pectin formulations for oral sustained drug delivery. **Int J Pharm**. v. 356, n. 1-2, p. 95-101, 2008.

IZQUIERDO, A.; ONO, S. S.; VOEGEL, J. C.; SCHAAF, P.; DECHER, G. Dipping versus Spraying: Exploring the Deposition Conditions for Speeding Up Layer-by-Layer Assembly. **Langmuir**. v. 21, n. 16, p. 7558-7567, 2005.

JEAN, B.; HEUX, L.; DUBREUIL, F. D. R.; CHAMBAT, G. R.; COUSIN, F. Non-Electrostatic Building of Biomimetic Cellulose–Xyloglucan Multilayers. **Langmuir**. v. 25, n. 7, p. 3920-3923, 2008.

JIA, Z.; QIN, Q.; DARVILL, A. G.; YORK, W. S. Structure of the xyloglucan produced by suspension-cultured tomato cells. **Carbohydrate Research**. v. 338, n. 11, p. 1197-1208, 2003.

JÓ, A. **Desenvolvimento e aplicação de nanoestruturas a partir de xiloglucanas**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

KALASHNIKOVA, I.; BIZOT, H.; CATHALA, B.; CAPRON, I. New Pickering Emulsions Stabilized by Bacterial Cellulose Nanocrystals. **Langmuir**. v. 27, n. 12, p. 7471-7479, 2011.

KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTROM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. **Angew Chem Int Ed Engl**. v. 50, n. 24, p. 5438-5466, 2011.

KOIZUMI, S.; YUE, Z.; TOMITA, Y.; KONDO, T.; IWASE, H.; YAMAGUCHI, D.; HASHIMOTO, T. Bacterium organizes hierarchical amorphous structure in microbial cellulose. **The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics**. v. 26, n. 1, p. 137-142, 2008.

KOOIMAN, P. **On the occurrence of amyloids in plant seeds.**, 1960.

KOYAMA, M.; HELBERT, W.; IMAI, T.; SUGIYAMA, J.; HENRISSAT, B. Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 94, n. 17, p. 9091-9095, 1997.

KÜMMERER, K.; MENZ, J.; SCHUBERT, T.; THIELEMANS, W. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. **Chemosphere**. v. 82, n. 10, p. 1387-1392, 2011.

LEVY, S.; YORK, W. S.; STUIKE-PRILL, R.; MEYER, B.; STAEHELIN, L. A. Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated sidechain in surface-specific sidechain folding. **The Plant Journal**. v. 1, n. 2, p. 195-215, 1991.

LI, W.; YUE, J.; LIU, S. Preparation of nanocrystalline cellulose via ultrasound and its reinforcement capability for poly(vinyl alcohol) composites. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 19, n. 3, p. 479-485, 2012.

LIMA, D. U.; BUCKERIDGE, M. S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carbohydrate Polymers**. v. 46, n. 2, p. 157-163, 2001.

LIMA, D. U.; LOH, W.; BUCKERIDGE, M. S. Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan. **Plant Physiol Biochem**. v. 42, n. 5, p. 389-394, 2004.

LIMA, N. N.; RECHIA, C. G. V.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 17, n. 6, p. 413-415, 1995.

LIMA, N. N.; REICHER, F.; CORREA, J. B. C.; GANTER, J. L. M. S.; SIERAAKOWSKI, M. R. Partial Structure of xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* Var. *Stilbocarpa* (Jatoba). **Ciencia e Cultura**. v. 45, n. 1, p. 22-25, 1993.

LOPEZ, M.; BIZOT, H.; CHAMBAT, G. R.; MARAIS, M.-F.; ZYKWINSKA, A.; RALET, M.-C.; DRIGUEZ, H.; BULÉON, A. Enthalpic Studies of Xyloglucan-Cellulose Interactions. **Biomacromolecules**. v. 11, n. 6, p. 1417-1428, 2010.

LU, P.; HSIEH, Y.-L. Preparation and properties of cellulose nanocrystals: Rods, spheres, and network. **Carbohydrate Polymers**. v. 82, n. 2, p. 329-336, 2010.

MAEDA, T.; YAMASHITA, H.; MORITA, N. Application of xyloglucan to improve the gluten membrane on breadmaking. **Carbohydrate Polymers**. v. 68, n. 4, p. 658-664, 2007.

MARCHESSAULT, R. H.; MOREHEAD, F. F.; KOCH, M. J. Some hydrodynamic properties of neutral suspensions of cellulose crystallites as related to size and shape. **Journal of Colloid Science**. v. 16, n. 4, p. 327-344, 1961.

MARTÍNEZ-SANZ, M.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**. v. 85, n. 1, p. 228-236, 2011.

MATHEW, A. P.; DUFRESNE, A. Morphological Investigation of Nanocomposites from Sorbitol Plasticized Starch and Tunicin Whiskers. **Biomacromolecules**. v. 3, n. 3, p. 609-617, 2002.

MCNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annu Rev Biochem.** v. 53, n. 1980s, p. 625-663, 1984.

MICHAEL, G.; REID, J. G. **Galactomannans and Other Cell Wall Storage Polysaccharides in Seeds.** CRC Press, 2006.

MUKHERJEE, S. M.; WOODS, H. J. X-ray and electron microscope studies of the degradation of cellulose by sulphuric acid. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 10, n. 0, p. 499-511, 1953.

NARRAINEN, A. P.; LOVELL, P. A. Mechanism and kinetics of free-radical degradation of xyloglucan in aqueous solution. **Polymer.** v. 51, n. 26, p. 6115-6122, 2010.

NOGI, M.; YANO, H. Transparent Nanocomposites Based on Cellulose Produced by Bacteria Offer Potential Innovation in the Electronics Device Industry. **Advanced Materials.** v. 20, n. 10, p. 1849-1852, 2008.

O'NEILL, R. A.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. Purification and characterization of a xyloglucan oligosaccharide-specific xylosidase from pea seedlings. **J Biol Chem.** v. 264, n. 34, p. 20430-20437, 1989.

PÄÄKKÖ, M.; ANKERFORS, M.; KOSONEN, H.; NYKÄNEN, A.; AHOLA, S.; ÖSTERBERG, M.; RUOKOLAINEN, J.; LAINE, J.; LARSSON, P. T.; IKKALA, O.; LINDSTRÖM, T. Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels. **Biomacromolecules.** v. 8, n. 6, p. 1934-1941, 2007.

PALIK, E. D. **Handbook of optical constants of solid.** Academic Press, London, 1985.

PEREIRA, E. M. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; JÓ, T. A.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; FRANÇA, R. F. O.; FONSECA, B. A. L.; PETRI, D. F. S. Lectins and/or xyloglucans/alginate layers as supports for immobilization of dengue virus particles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v. 66, n. 1, p. 45-52, 2008.

RAINTREE. Disponível em: <http://www.rain-tree.com/Plant-Images/>. Data acessada: 02 de dezembro de 2012

RAMOS, L.; BREUIL, C.; SADDLER, J. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** v. 34-35, n. 1, p. 37-48, 1992.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**. v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

RANBY, B. G.; BANDERET, A.; SILLÉN, L. G. Aqueous Colloidal Solutions of Cellulose Micelles. **Acta Chemica Scandinavica**. v. 3, n. p. 649-650, 1949.

RAO, P. S. S., H.C. **Industrial Gums - Polysaccharides and Their Derivatives**. California. Academic Press, 1973.

REN, Y.; PICOUT, D. R.; ELLIS, P. R.; ROSS-MURPHY, S. B.; REID, J. S. G. A novel xyloglucan from seeds of *Azela africana* Se. Pers.—extraction, characterization, and conformational properties. **Carbohydrate Research**. v. 340, n. 5, p. 997-1005, 2005.

RIBEIRO, C.; ARIZAGA, G. G. C.; WYPYCH, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Nanocomposites coated with xyloglucan for drug delivery: In vitro studies. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 367, n. 1–2, p. 204-210, 2009.

ROMAN, M.; WINTER, W. T. Effect of Sulfate Groups from Sulfuric Acid Hydrolysis on the Thermal Degradation Behavior of Bacterial Cellulose. **Biomacromolecules**. v. 5, n. 5, p. 1671-1677, 2004.

SAMIR, M. A. S. A.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field. **Biomacromolecules**. v. 6, n. 2, p. 612-626, 2005.

SHEYKHNAZARI, S.; TABARSA, T.; ASHORI, A.; SHAKERI, A.; GOLALIPOUR, M. Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**. v. 86, n. 3, p. 1187-1191, 2011.

SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; NISHINARI, K. Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme. **Food Hydrocolloids**. v. 12, n. 1, p. 25-28, 1998.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. San Diego. Academic Press, 1993.

SOLOMONS, T. W. G. **Organic Chemistry**. New York. John Wiley, 1996.

SOUZA, C. F.; LUCYSZYN, N.; WOEHL, M. A.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; BORSALI, R.; SIERAKOWSKI, M. R. Property evaluations of dry-cast reconstituted bacterial

cellulose/tamarind xyloglucan biocomposites. **Carbohydr Polym.** v. 93, n. 1, p. 144-153, 2013.

STUPP, T.; DE FREITAS, R. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; DESCHAMPS, F. C.; WISNIEWSKI JR, A.; BIAVATTI, M. W. Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorfii* seeds and seed oil. **Bioresource Technology.** v. 99, n. 7, p. 2659-2663, 2008.

SUSLICK, K. S. Sonochemistry. **Science.** v. 247, n. 4949, p. 1439-1445, 1990.

TISCHER, P. C. S. F.; SIERAKOWSKI, M. R.; WESTFAHL, H.; TISCHER, C. A. Nanostructural Reorganization of Bacterial Cellulose by Ultrasonic Treatment. **Biomacromolecules.** v. 11, n. 5, p. 1217-1224, 2010.

WANG, N.; DING, E.; CHENG, R. Thermal degradation behaviors of spherical cellulose nanocrystals with sulfate groups. **Polymer.** v. 48, n. 12, p. 3486-3493, 2007.

WINTER, H. T.; CERCLIER, C.; DELORME, N.; BIZOT, H.; QUEMENER, B.; CATHALA, B. Improved Colloidal Stability of Bacterial Cellulose Nanocrystal Suspensions for the Elaboration of Spin-Coated Cellulose-Based Model Surfaces. **Biomacromolecules.** v. 11, n. 11, p. 3144-3151, 2010.

WONG, S.-S.; KASAPIS, S.; HUANG, D. Molecular weight and crystallinity alteration of cellulose via prolonged ultrasound fragmentation. **Food Hydrocolloids.** v. 26, n. 2, p. 365-369, 2012.

YORK, W. S.; KUMAR KOLLI, V. S.; ORLANDO, R.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. The structures of arabinoxyloglucans produced by solanaceous plants. **Carbohydrate Research.** v. 285, n. 0, p. 99-128, 1996.

ZHANG, J.; ELDER, T. J.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. J. Facile synthesis of spherical cellulose nanoparticles. **Carbohydrate Polymers.** v. 69, n. 3, p. 607-611, 2007.

ZHANG, Q.; BRUMER, H.; AGREN, H.; TU, Y. The adsorption of xyloglucan on cellulose: effects of explicit water and side chain variation. **Carbohydrate research.** v. 346, n. 16, p. 2595-2602, 2011.

ZUGENMAIER, P. Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. **Progress in Polymer Science.** v. 26, n. 9, p. 1341-1417, 2001.